Histochemické změny po účinku vysoce toxických inhibitorů cholinesteráz ve vybraných částech centrální a periferní nervové soustavy

Dizertační práce

MUDr. Petr Hájek

Ústav anatomie

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program

Anatomie, histologie a embryologie

Školitel: Doc. MUDr. Dáša Slížová, CSc.

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

Hradec Králové, 2008

Poděkování

Děkuji svým školitelům doc. MUDr. Dáše Slížové, CSc. a doc. MUDr. Jiřímu Bajgarovi, DrSc. za péči, povzbuzování a vedení po odborné stránce. Oběma jsem velmi vděčen též za cenné rady při řešení grantového projektu a při publikační činnosti.
Velmi děkuji laborantkám ústavu anatomie paní Daně Ellingerové, paní Janě Bezouškové a slečně Lence Matyáskové. Bez jejich zručnosti a vstřícnosti by nebylo možné zavést metodiku naší práce.

Ing. Lukáši Čapkovi, Ph.D. děkuji za praktické návody k digitální analýze obrazu a za přátelskou podporu po dobu mého studia.

Ing. Josefu Bukačovi MS Ph.D. jsem zavázán za konzultace k problematice statistického zpracování.

MUDr. Otakaru Krsovi, CSc. vděčím zejména za pomoc s vyhledáním literatury. MUDr. Filipu Caisbergerovi děkuji za kritické připomínky týkající se chemické stránky problematiky.

Výsledků práce bylo dosaženo za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy. Řešený projekt byl veden pod č.82/2005 a názvem „Histochemické změny nervového systému vyvolané vysoce toxickými inhibitory cholinesteráz".

Nebývá vždy zvykem v odborné práci vyjádřit poděkování ryze osobní. Přesto zde na závěr musím poděkovat své družce Markétě, která se po dobu psaní mé dizertační práce statečně starala o naše novorozená dvojčata a velmi trpěla mým studijním a pracovním zaneprázdněním. S láskou děkuji.

Petr Hájek

Obsah

Poděkování 2
Obsah 3
Seznam použitých zkratek 7
1. Úvod 9
2. Literární přehled 10
2.1 Acetylcholin, jeho metabolismus, funkce a lokalizace 10
2.1.1 Acetylcholin 10
2.1.2 Lokalizace acetylcholinu v CNS 10
2.1.3 Deficit a nadbytek acetylcholinu v CNS 11
2.1.4 Receptory pro acetylcholin 11
2.1.5 Acetylcholinesteráza 12
2.1.6 Inhibice acetylcholinesterázy 13
2.1.7 Lokalizace acetylcholinesterázy 14
2.1.8 Butyrylcholinesteráza 15
2.1.9 Cholinacetyltransferáza 16
2.1.10 Další enzymy týkající se problematiky otravy NPL 17
2.2 Inhibitory a reaktivátory AChE 19
2.2.1 Organofosfáty 19
2.2.2 Nervově paralytické látky 20
2.2.3 Karbamáty 22
2.2.4 Další inhibitory acetylcholinesterázy 23
2.2.5 Reaktivátory acetylcholinesterázy 23
2.3 Patofyziologie otravy OF a morfologické změny ve tkáních 26
2.3.1 Biologické účinky OF 26
2.3.2 Histopatologické změny 27
2.3.3 Histochemické změny 29
2.3.4 Heterogenita CNS 30
2.4 Toxikologické a klinické aspekty 32
2.4.1 Toxické látky – definice pojmů 32
2.4.2 Toxikokinetika organofosfátů 32
2.4.3 Akutní otrava organofosfáty 34

2.4.4 Akutní cholinergní krize 34
2.4.5 Stupně akutní otravy 34
2.4.6 Opožděná fáze otravy OF 36
2.4.7 Pozdní neurotoxický efekt 36
2.4.8 Chronická otrava 37
2.4.9 Diagnostika otrav NPL 37
2.4.10 Terapie 38
2.4.11 Profylaxe 39
2.4.12 Využití inhibitorů cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy choroby 40
2.5 Laboratorní metody průkazu aktivity AChE 42
2.5.1 Histochemický průkaz 42
2.5.2 Metoda Karnovskyho a Rootse 42
2.5.3 Biochemické metody 43
2.5.4 Další metody průkazu AChE 44
2.5.5 Kvantifikace histochemických metod 44
2.6 Experimentální poznatky 48
2.6.1 Laboratorní potkan jako model pro otravu organofosfáty 48
2.6.2 Problematika somanu 49
2.6.3 Použitelnost antidot 49
2.6.4 Další nezodpovězené otázky 51
3. Cíle práce 52
4. Materiál a metody 54
4.1 Základní metodika 54
4.1.1 Zvířecí model 54
4.1.2 Chemikálie 54
4.1.3 Experimentální intoxikace a zpracování biologického materiálu 54
4.1.4 Histochemické vyšetření 55
4.1.5 Histologické preparáty 56
4.1.6 Hodnocení 56
4.1.7 Preparáty bránice 57
4.1.8 Statistické hodnocení 57
4.2 Ověření metodiky 57
4.3 Korelace s biochemickým stanovením 58
4.3.1 Intoxikace, zpracování biologického materiálu a histochemické vyšetření 58

4.3.2 Biochemické vyšetření 58
4.3.3 Definice vyšetřovaných oblastí mozku 59
4.4 Inhibice acetylcholinesterázy G-látkami 60
4.5 Inhibice acetylcholinesterázy V-látkami 60
4.6 Protektivní účinek huperzinu A 60
4.7 Účinek antidot při otravě tabunem 61
4.8 Vyšetření jader respiračního centra 61
4.9 Reaktivace AChE v blízkosti cirkumventrikulárních orgánů 61
4.10 Histochemické preparáty bránice 62
5. Výsledky 63
5.1 Ověření metodiky 63
5.2 Korelace s biochemickým pokusem 64
5.3 Inhibice acetylcholinesterázy G-látkami 67
5.3.1 Sledování klinických známek otravy 67
5.3.2 Popis histochemického obrazu v kontrolní skupině 67
5.3.3 Popis histochemického obrazu otravy G-látkami 68
5.4 Inhibice acetylcholinesterázy V-látkami 71
5.4.1 Sledování klinických známek otravy 71
5.4.2 Popis histochemického obrazu otravy V-látkami 71
5.5 Protektivní účinek huperzinu A 73
5.5.1 Sledování klinických známek otravy 73
5.5.2 Popis histochemického obrazu při profylaktickém užití huperzinu A 74
5.5.3 Kvantifikace nálezu 74
5.6 Účinek antidot při otravě tabunem 79
5.6.1 Sledování klinických známek otravy 79
5.6.2 Popis histochemického obrazu otravy tabunem s antidotální léčbou 79
5.6.3 Kvantifikace nálezu 80
5.7 Vyšetření jader respiračního centra 84
5.8 Reaktivace AChE v blízkosti cirkumventrikulárních orgánů 85
5.9 Histochemické změny na bránici 88
6. Diskuze 89
6.1 Metoda 89
6.2 Intoxikace zvířat 90
6.3 Výběr histochemické metody 90

6.4 Výroba histochemických preparátů 91
6.5 Digitální analýza obrazu 92
6.6 Interpretace výsledků 93
6.7 Výsledky ověření metody 93
6.8 Výsledky korelace 94
6.9 Nález při otravě G-látkami a V-látkami 95
6.10 Výsledky profylaktického užití huperzinu A 95
6.11 Výsledky použití antidot 96
6.12 Vyšetření jader respiračního centra 97
6.13 Reaktivace AChE v blízkosti cirkumventrikulárních orgánů 98
6.14 Histochemické změny na bránici 99
6.15 Možnosti dalšího pokračování práce 99
7. Závěry 101
8. Použitá literatura 103

Seznam použitých zkratek

acetyl-CoA – acetylkoenzym A

ACh - acetylcholin

AChE - acetylcholinesteráza

ACTH – kortikotropní hormon

AP - alkalická fosfatáza

AST - aspartátaminotransferáza

BCHL – bojová chemická látka

BuChE – butyrylcholinesteráza (též pseudocholinesteráza, nespecifická cholinesteráza)

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CCD – charge-coupled device (zařízení s vázanými náboji)

cGMP – cyklický guanosinmonofosfát

CNS – centrální nervová soustava

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

DFP - diizopropylfluorofosfát

DMC – 3-dietylaminofenyl-N-metylkarbamát methojodidu

DDVP - dichlorodimetylvinylfosfát

EKG – elektrokardiograf

FVZ UO – Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany

GIT – gastrointestinální trakt

HCD – horní cesty dýchací

HEB – hematoencefalická bariéra

ChAT – cholinacetyltransferáza

ChE – cholinesterázy

IC_{50} - střední inhibiční koncentrace

i.m. – intramuskulární podání

i.p. – intraperitoneální podání

IsoOMPA – tetraisopropylpyrofosforamid

i.v. – intravenózní podání

IVA - látka se střední těkavostí

LCt_{50} – střední letální koncentrace

LD_{50} – střední letální dávka

MTX – 7-methoxytacrin

NMDA – N-metyl-D-aspartát receptor

NOS – syntáza oxidu dusnatého

NPL - nervově paralytická látka

NTE – neurotoxická esteráza

OF – organofosfát(y)

OVLT - organum vasculosum laminae terminalis

OPIDN - OrganoPhosphate Induced Delayed Neuropathy, viz PNE

p.c. – perkutánní vstup

p.o. – podání per os

PNE – pozdní neurotoxický efekt (v anglických textech OPIDN)

PNS – periferní nervová soustava

REM – rapid eye movement (rychlé oční pohyby)

RF – retikulární formace

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

SEM – scanning electron microscope (rastrovací elektronový mikroskop)

TEPP - tetraetylfosfát

TOCP – trioxokresylfosfát

VRG - ventral respiratory group (ventrální respirační skupina)

WHO – Světová zdravotnická organizace

Dále je v textu použito několik kódových označení chemických látek, jejichž písmena nemají zřejmou souvislost s pojmenováním, proto zde nejsou uvedeny.

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. Teroristické použití NPL je nevyzpytatelné a může postihnout bez rozdílu vojáky i civilisty. Asi nejznámější případ tohoto druhu je z roku 1995, kdy japonská sekta Óm Šinrikjó použila sarin v tokijském metru. Bylo zde zasaženo 5000 lidí, 12 lidí zemřelo. Krutou daň si díky svému rozšíření v zemědělství a průmyslu vybírají i méně toxické organofosfáty. Podle WHO na světě ročně dojde k 1 miliónu náhodných vážných otrav a 2 miliónům sebevražedných pokusů insekticidy. Zhruba 200 000 těchto otrav vede ke smrti (Jeyaratnam, 1990).

Středem zájmu toxikologů je proto v současné době vývoj co nejúčinnějšího antidota jak pro profylaktické použití, tak pro terapii otravy NPL. Zcela uspokojujícího výsledku na tomto poli dosud nebylo dosaženo.

Tato dizertační práce se věnuje změnám v aktivitě některých enzymů po účinku NPL a po účinku látek používaných k léčbě nebo profylaxi otrav organofosfáty. Snažili jsme se toto toxikologické téma uchopit z pohledu morfologického. Následující literární rešerše proto shrnuje současné poznatky o toxikologických i morfologických aspektech otravy organofosfáty.

Abychom mohli přispět k poznatkům o mechanizmu 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 Acetylcholin, jeho metabolismus, funkce a lokalizace

2.1.1 Acetycholin

Acetylcholin (ACh) byl první látkou rozpoznanou jako neuromediátor. Je vytvářen v nervových zakončeních reakcí cholinu a acetylkoenzymu A (acetyl-CoA) katalyzovanou cholinacetyltransferázou (ChAT). ACh je specifickým přenašečem ukládán do synaptických váčků, které jsou při pozorování v elektronovém mikroskopu kulovité, průhledné a homogenní (agranulární váčky; typ I Grayových synapsí). Část ACh zůstává volná v cytoplazmě. Po uvolnění do synaptické štěrbiny je nenavázaný ACh velmi rychle hydrolyzován AChE na acetát a cholin. Většina cholinu je poté přenesena vysokoafinitním přenosovým systémem závislým na Na+ zpět do presynaptického zakončení a použita při syntéze ACh. V necholinergních synapsích může ACh působit jako neuromodulátor (např. inhibicí Na+/K+ pumpy) (Fišar et Jirák, 2001).

2.1.2 Lokalizace acetylcholinu v CNS

Acetylcholin je činný jako neurotransmiter na nervosvalových ploténkách, na synapsích ganglií i v CNS. V mozku působí zejména jako neuromodulační transmiter. Zde je rozmístěn v jiných oblastech a komplexněji než analogické neurotransmitery a modulátory, jako jsou noradrenalin, serotonin a dopamin. Lokalizace ACh v CNS:

1) Septum verum a jeho dráhy do hipokampu a nc. basalis Meynerti a amygdaly (dorsální jádra septa) (Perry, 1998) a jeho spoje do neokortexu (mediální jádra septa) (Bajgar, 1991). Tento cholinergní systém předního mozku pravděpodobně udržuje mozkovou kůru v jejích funkcích a v činnostech jako jsou kognitivní funkce, paměť, rozlišovací schopnosti, schopnost úsudku, učení a afektivních reakcí. ACh pravděpodobně umožňuje a usnadňuje synaptickou aktivitu ostatních, tj. výkonných neurotransmiterů, jako je např. glutamát.

2) Retikulární formace v mozkovém kmeni, odkud svým působením ACh ovládá především thalamus. Přívod podnětu z kmene do thalamu je z 90 % cholinergní. Aktivace cholinergních neuronů v mozkovém kmeni je spojena se vzbuzením, s vigilitou, s REM spánkem, se sny a s aktivací mozkové kůry.

3) Striatum, kde je cholinergních neuronů asi 1 %. Vzdor tomuto malému podílu patří striatum k nejaktivnější mozkové cholinergní struktuře. Neurony ve striatu mají největší presynaptické rezervy ACh, nejvíce aktivity cholinacetyltransferázy i acetylcholinesterázy a

postsynaptických muskarinových receptorů. Tyto cholinergní neurony ve striatu v oblasti bazálních ganglií řídí extrapyramidové pohyby a projevy a podílejí se nepřímo na cholinergní modulaci mozkové kůry ve frontální oblasti (Perry, 1998). Cholinergní systém striata zahrnuje patrně zejména interneurony (Gupta, 2004). Množství ACh ve striatu laboratorního potkana bylo stanoveno na 636 pmol/mg tkáně (Lim et al., 1987).

2.1.3 Deficit a nadbytek acetylcholinu v CNS

Deficit ACh v CNS vede zhoršení kognitivních funkcí. Při Alzheimerově chorobě byla nalezena těsná korelace závažnosti choroby a nedostatku ACh v hipokampu a v sousedním spánkovém laloku. Obdobné histologické nálezy jsou při stárnutí, Parkinsonově chorobě, Downově syndromu u pacientů středního věku, u cerebrovaskulárních demencí, ale i při a po kraniocerebrálních poraněních. Byly zjištěny nekognitivní projevy při snížení ChAT - optické halucinace, apatie, či naopak agitace. Antagonista muskarinu - skopolamin navozuje zhoršení paměti, bdělosti, duševní pohotovosti a snižuje schopnost pozornosti a rozlišování. Antagonista nikotinových receptorů mekamylamin prostupující HEB vyvolal při pokusném použití výpadky paměti a pozornosti, podobné Alzheimerově chorobě (Perry, 1998).

K nadbytku ACh v CNS dochází při inhibici AChE. Patofyziologie a klinický obraz je předmětem dalších částí literárního přehledu. Méně toxické inhibitory AChE zvyšují nabídku ACh a jsou tedy v poslední době využívány k léčbě Alzheimerovy choroby (Bajgar, 2005).

2.1.4 Receptory pro acetylcholin

Acetylcholinový receptor je buď muskarinového nebo nikotinového typu. V PNS jsou muskarinové receptory na efektorech parasympatiku, nikotinové ve vegetativních gangliích parasympatiku i sympatiku a na nervosvalových ploténkách. V CNS převládá muskarinový typ.

Z pěti známých muskarinových subtypů receptorů M1-M5 je v CNS zastoupen M1 s predilekcí v předním mozku v kůře a ve striatu a M2 subtyp, který je naopak rozložen poměrně pravidelně. Agonisté i antagonisté mohou mít různou afinitu k těmto subtypům. Organofosfáty reagují s M2 subtypem. M receptory zprostředkovávají kontrolu motoriky, regulaci teploty, kardiovaskulární regulaci a paměť (Gupta, 2004; Scarepo et Dmochowski, 2003).

Nikotinový receptor je složen z alfa a beta podjednotky, přičemž u hlodavců je známo 11 možných podjednotek (α2-α9, β2-β4), u člověka jich je devět. Kombinace těchto řetězců může generovat řadu subtypů s rozličnými fyziologickými a farmakologickými vlastnostmi,

podrobnosti však dosud nejsou objasněny. Distribuce je i u nikotinových receptorů rozdílná, navíc část receptorů je lokalizována presynapticky, což může regulovat uvolňování neurotransmiterů (Perry, 1998; Volpicelli et Levey, 2004; Patočka et al., 2004, Gupta, 2004).

Příklady látek uplatňujících se na acetylcholinovém receptoru:

- agonisté M: ACh, muskarin, metoclopramid, pilocarpin,...
- antagonisté M: atropin, skopolamin, mambatoxin,...
- agonisté N: ACh, nikotin, metylkarbamylcholin, cytisin, dimetylpiperazin,...
- antagonisté N: tubocurarin, lophotoxin, conotoxin M11, mekylamin...

Vysoce selektivní antagonisté M nebo N receptorů, které se uplatňují u všech podtypů, se používají pro experimentální kvantitativní vyšetření. Pro M receptory je to quinuklidinyl benzilát značený tritiem, pro N receptory α-bungarotoxin značený radionuklidem jodu (Gupta, 2004).

2.1.5 Acetylcholinesteráza

Acetylcholinesteráza (AChE, EC 3.1.1.7.) je enzym přítomný zejména v nervové a svalové soustavě, který rozkládá ACh působící na receptoru postsynaptické membrány. Toxický účinek OF je dán právě zejména zablokováním AChE (Bajgar, 1985; Patočka et al., 2004).

AChE je glykoprotein vázaný na postsynaptickou membránu. Je jedním z nejaktivnějších enzymů, které jsou známy. Počet molekul substrátu, které zreagují působením jedné molekuly enzymu za jednotku času (= číslo přeměny), je pro AChE při 37 °C rovno 10^6 za minutu. Díky tomu se synapse už za zlomek milisekundy uvolní pro další impuls (Moore, 1979).

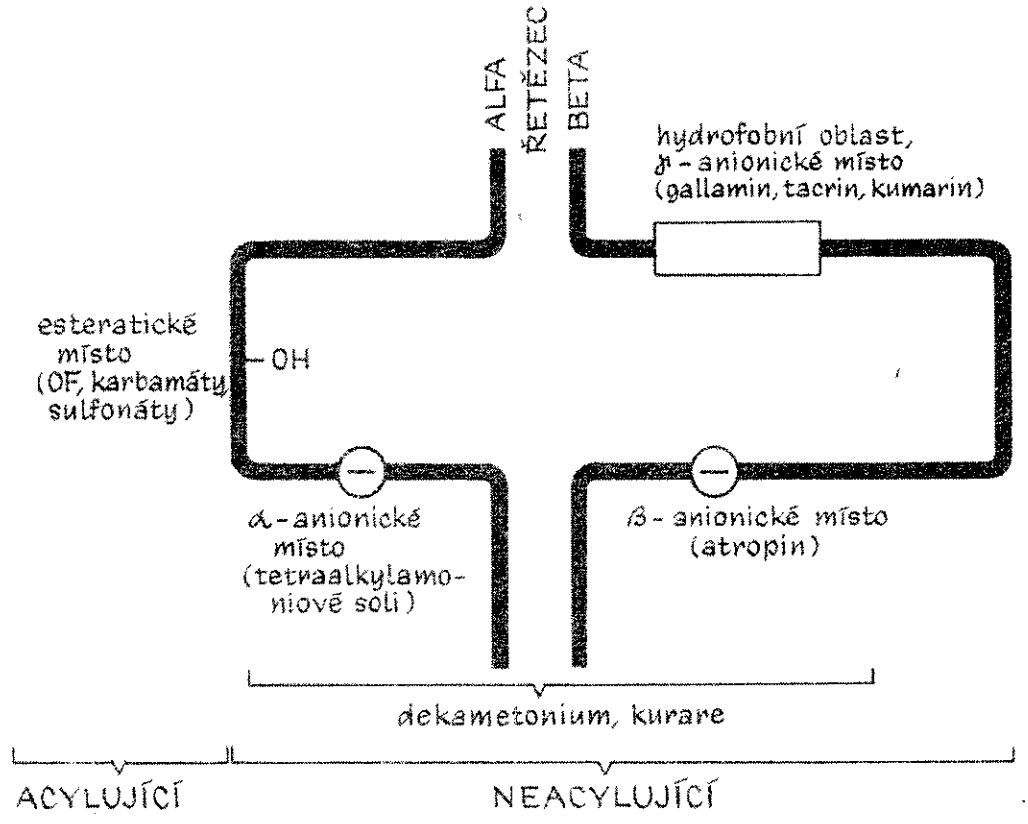
AChE je tvořena molekulou, v níž se vyskytují 2 alfa a 2 beta podjednotky. Tzv. aktivní povrch molekuly (obr. 1) je místo, kde se k sobě přibližují na alfa řetězci

- alfa anionické místo (COOH konec glutamátu)
- esteratické místo (OH konec serinu; toto místo je místem zásahu organofosfáty, karbamáty a sulfonáty, které zde působí ireverzibilním mechanismem acylace.

Na beta řetězci se na aktivním povrchu nacházejí tzv. alosterická místa:

- beta anionické místo (= periferní anionické, akcelerační; zde navázání kalcium urychluje hydrolýzu ACh, místo je možno blokovat atropinem, dexamethoniem, kurare (ovšem in vivo se mnohem více uplatní jejich kompetitivní inhibice acetylcholinového receptoru, čili ve výsledku blokují účinek ACh)
- gama anionické místo (hydrofobní; zde působí kumarin, gallamin, tacrin, MTX,

stejně jako u atropinu jde o reverzibilní inhibici neacylací, pouze elektrostatickými silami) (Patočka et al., 1979; Bajgar, 1985).



Obr. 1. Schéma aktivního centra AChE. Obrázek převzat z literatury: Bajgar, 1985; Bajgar, 2004

2.1.6 Inhibice acetylcholinesterázy

Inhibice AChE může probíhat na několika místech molekuly několika možnými druhy vazeb, jak je zmíněno v předchozím odstavci. Nejzávažnější z biologického hlediska je vazba fosforylací na esteratickém místě. Enzym fosforylovaný OF se jen minimálně spontánně navrací do funkčního stavu. Tuto reaktivaci je možno urychlit tzv. reaktivátory cholinesteráz - viz odstavec 2.2.5 Reaktivátory acetylcholinesterázy. U některých OF ovšem fosforylovaná AChE podléhá dealkylaci (tzv. ageing, stárnutí), která neovlivňuje toxicitu OF, ale omezuje možnost použití reaktivátorů. Podstatou této dealkylace je zkrácení navázané molekuly o alkyl, jehož alkoxylová skupina se působením vody rozpadá na dva hydroxylové konce (Patočka et al., 1979).

Pro inhibici AChE má význam i její polymorfismus v kvarterní struktuře. AChE může tvořit dimer nebo tetramer, výsledkem jsou globulární formy G1, G2 nebo G4. Tetramery ještě mohou být pospojovány navázáním dalších sloučenin do asymetrických forem A4, A8, A12 (Bajgar, 2005). Bajgar prokázal elektroforézou v potkaním mozku 4 molekulární formy

AChE s rozdílnou afinitou k OF v rozmezí jednoho řádu. Forma 1, která představovala asi 10% celkové aktivity, po intoxikaci OF téměř neztratila aktivitu (Bajgar, 1991). Nejcitlivější forma 4 je patrně nejdůležitější pro cholinegní přenos (Bajgar, 2004).

2.1.7 Lokalizace acetylcholinesterázy

AChE se vyskytuje v erytrocytech, nervových a svalových buňkách (Lojda et al., 1979), v plicích a slezině (Patočka et al., 2004) a v menší míře i v dalších orgánech a tkáních, dokonce i v rostlinné říši (Bajgar, 2005). Funkce AChE v erythrocytech není zcela známa (Bajgar, 2004). Jako možné nekatalytické funkce AChE se uvádějí např. buněčná adheze a proliferace, či růst axonu (Day et Greenfield, 2002).

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. Podrobnějším vyšetřením mozkových oblastí, například kvantitativní histochemií byly zjištěny tyto údaje: V potkaním mozku má fyziologicky nejvyšší aktivitu striatum (komplex caudatum – putamen). V diencephalu je nejsilnější aktivita AChE v anteroventrálních jádrech thalamu, silná aktivita je lokalizována do retikulárních jader thalamu, zadní pretektální oblasti, přední pretektální oblasti, zona incerta a substantia nigra. Mírná aktivita AChE je v laterálních dorsálních jádrech a nc. posteriores. Nízká nebo žádná aktivita AChE je ve ventrolaterálních, ventrálních posterolaterálních a ventrálních posteromediálních jádrech thalamu.

V mozečku je aktivita AChE silná v buňkách granulární vrstvy a v jádrech. Další vrstvy kůry mají slabou aktivitu AChE.

V mesencephalu mají silnou aktivitu colliculi inferiores et superiores (strata grisea), v pontu a v oblongatě motorická jádra hlavových nervů a některá jádra retikulární formace, zejména rafeální.

Ve starších částech kůry je zřetelná stratifikace. V hipokampu jako celku je středně silná aktivita AChE, ovšem nerovnoměrně rozložená do vrstev, silnou aktivitou vyniká pyramidální vrstva. V gyrus dentatus má silnou aktivitu granulární vrstva.

V neokortexu je slabší aktivita AChE, histochemicky se projevuje nejvýrazněji v neuronech a vláknech IV.vrstvy a též ve vláknech I. a VI. vrstvy (Ma et al., 2001; Lassiter et al., 1998).

V mozku se vyskytují 2 ze 4 globulárních forem AChE – G1 a G4. G4 je membránově vázaná, s katalytickým místem extracelulárně, G1 je omezena na intracelulární kompartment (Bajgar, 1991; Bajgar, 2004). Jiné buňky než neurony nelokalizují AChE na membránách, ale perinukleárně (Thullbery et al., 2005). V kosterní svalovině má AChE patrně význam během

ontogeneze, spolupodílí se na vývoji neuromuskulární ploténky. Během vývoje zde byly zaznamenány změny v IC lokalizaci v souvislosti s fúzí myocytů a s inervací svalových vláken, kdy se finálně většina AChE koncentruje v oblasti nervosvalých plotének (Grubič et al., 1999).

Přítomnost atypických molekulárních forem a zvýšení aktivity AChE v rektální biopsii je jednou z diagnostických známek Hischprungovy choroby. U určitých patologií se totiž mění zastoupení molekulárních forem (v rektální biopsii při Hirschprungově chorobě), nebo jejich aktivita (v mozku při hypertenzi, což může souviset s tím, že katecholaminy mohou ovlivňovat cholinergní přenos) (Bajgar, 1991; Nakao et al., 2001).

Rozdílem 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. Tento jev charakteristický pro některé enzymy se v případě AChE vysvětluje její terciární strukturou. Katalytické místo enzymu je na dně úzké prohlubně, zatímco na jejím okraji jsou další vazebná místa pro ACh. Tato místa mají slabší vazebnou schopnost, ale při nadbytku substrátu omezují přístup ACh ke katalytickému centru a snižují tak rychlost enzymatické reakce (Kodíček et Karpenko, 2000; Radic et al., 1991).

2.1.8 Butyrylcholinesteráza

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 (Wright et al., 1993). V mozku potkanů tvoří BuChE asi 20% aktivity cholinesteráz, s lokalizací hlavně v glii. V lidském 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). Aktivita BuChE v mozkomíšním moku tvoří asi 5% z celkové aktivity cholinesteráz (Scarsella et al., 1979). Geneticky je dáno nositelství izoenzymů a tím i individuálně snížená až téměř žádná aktivita (Bajgar, 2005). Je známo víc než 11 izoenzymových variant. BuChE štěpí ACh a stejně rychle nebo i rychleji delší estery cholinu, kys. propionovou a máselnou. Na rozdíl od AChE neštěpí D-β-metylacetylcholin (Patočka et al., 2004) a není inhibována vyššími koncentracemi ACh (Lojda et al., 1979; Patočka et al., 2004). Inhibice BuChE při otravě OF má menší význam, ale lze ji sledovat jako screening při

profesionální expozici OF (Schneider et al., 1994). Funkce BuChE v plazmě není přesně známa, v mozku má patrně význam pro cholinergní transmisi (Bajgar, 2005). Existují hypotézy o roli BuChE v metabolismu lipoproteinů (Kutty et Payne, 1994), neurogenezi (Layer et Willbold, 1995), roli vychytávače toxinů – scavengera (Schwarz et al., 1995), apod., dokonce i o katalytické funkci na synapsích neuromuskulární junkce (Glick et al., 2003). Hydrolyzuje i některé necholinové estery, mimo jiné suxamethonium, aspirin, prokain, mezokain a kokain - až s možným terapeutickým významem (Carmona et al., 2000; Masson et al., 1998; Brimijoin et Lockridge, 2003).

Rozvržení aktivity BuChE ve vybraných částech CNS u potkana:
BuChE jeví nejsilnější aktivitu v thalamu – v nuclei laterales dorsales, ventrolaterales a ventrales posterolaterales. Aktivita BuChE v neokortexu je velmi slabá, lokalizovaná do cévních endotelií. Též v hipokampu je BuChE detekovatelná prakticky jen v cévních endoteliích. BuChE je možno slabě detekovat v buňkách granulární vrstvy mozečku. Ve striatu je rovněž slabá aktivita (Ma et al., 2001; Lassiter et al., 1998).

Aktivita obou cholinesteráz vzrůstá během ontogeneze potkana. Aktivita AChE vzrůstá pravidelně, BuChE méně pravidelně s maximem v 19. dni intrauterinního života. Druhé maximum dosahuje BuChE ve 20. dnu postnatálního života. Ve stejnou dobu dosáhne maximálních hodnot celková aktivita AChE v potkaním mozku. Obě cholinesterázy pak už udržují víceméně konstantní hladinu. Poměr aktivity obou enzymů během intrauterinního života stoupá ve prospěch AChE až na desetinásobek (Lassiter et al., 1998).

2.1.9 Cholinacetyltransferáza

V metabolismu acetylcholinu se uplatňuje i enzym, který ACh syntetizuje – cholinacetyltransferáza (ChAT), EC 2.3.1.6. ChAT v nervovém systému se nachází specificky v místech syntézy ACh; v cholinergních neuronech je koncentrována v nervových zakončeních a váže se také na vnější povrch synaptických váčků. Lokalizace cholinergních neuronů, tedy neuronů vykazujících ChAT, nemá žádnou spojitost s neurony vykazujícími aktivitu AChE. Experimentálně ovšem lze prokázat snížení aktivity AChE ve vybrané struktuře po pokusné lézi zdrojového cholinergního jádra (Bajgar, 1991).

V syntéze ACh není limitujícím prvkem aktivita enzymu. Rychlost syntézy je určena přítomností acetyl-CoA (jeho prekurzorem v mozku je pyruvát, produkt glykolýzy) či jeho přenosem z vnitřní membrány mitochondrií do cytoplazmy. Rychlost syntézy ACh však nejvíce ovlivňuje příjem (uptake, influx) cholinu do buněk zprostředkovaný vysokoafinitním

přenašečovým systémem. Je známo, že při neuronální aktivitě může docházet ke zvýšení tohoto příjmu. Nervová tkáň není sama schopna syntetizovat cholin a plazmatický cholin neprochází hematoencefalickou bariérou. V CNS vzniká volný cholin jednak v synaptických štěrbinách hydrolýzou uvolněného ACh, jednak v presynaptických i mimosynaptických oblastech neuronů i glií štěpením látek obsahujících cholin (fosfatidylcholinu, lysofosfatidylcholinu, glycerol 3-fosforylcholinu) (Fišar et Jirák, 2001).
V potkaním mozku existují tři formy ChAT. Nejvyšší aktivita celkové ChAT byla nalezena ve striatu, aktivita u různých jader mozku se liší asi čtyřnásobně (Benishin et Carroll, 1983). U novorozených potkanů tvoří ChAT asi 10% aktivity dospělého jedince.

Přítomnost ChAT lze prokázat imunohistochemicky. V rámci této metody lze provést například dvojstupňovou imunofluorescenční reakci, kde primární protilátkou je oslí protilátka proti ChAT vyšetřovaného živočišného druhu, sekundární protilátkou pak anti-oslí protilátka s navázaným fluorochromem.

2.1.10 Další enzymy týkající se problematiky otravy NPL:

Karboxylesteráza – EC 3.1.1.1. je esteráza přítomná v plazmě, zapojená do metabolismu lipidů a do detoxifikačních pochodů. Je lokalizována v nejrůznějších tkáních, nejvíce v játrech, velmi málo v mozku (Gupta, 2004). U člověka je ovšem mnohem méně aktivní než u hlodavců (Redinbo, 2003). Při otravě OF na sebe váže jed a proto funguje spolu s BuChE jako scavenger (viz odstavec 2.4.11 Profylaxe). Interakce OF a karbamátů s karboxylesterázou je podobná interakcím s AChE.

Neurotoxická esteráza (NTE, neuropathy target esterase, phenylvalerate hydrolyzing esterase) je přítomná v nervové tkáni, lymfocytech a trombocytech. Nebyla dosud isolována a její fyziologická funkce dosud není známa (Abou-Donia, 1995). Lze vyšetřit biochemicky (Maroni et Bleecker, 1986) i histochemicky (Koelle et al., 1989). V posledních letech se autoři shodují, že právě inhibice NTE některými organofosfáty je zodpovědná za tzv. pozdní neuroxický efekt (PNE) - viz odstavec 2.4.7 Pozdní neuroxický efekt. Její stanovení 15 – 30 minut po aplikaci OF již umožňuje posoudit případný rozvoj PNE syndromu (Khodakovskaja et al., 2003).

Ca^{2+} kalmodulin kináza II – EC 2.7.11.17 je enzym přítomný v řadě tkání včetně mozku. Jeho interakce s OF vede k uvolňování kalcia, což může souviset s PNE (Bartošová, 2006; BRENDA, 2008).

Arylesteráza (paraoxonáza, PON1 a řada dalších synonym) – EC 3.1.1.2, EC 3.1.8.1 - je enzym přítomný v séru a játrech, jehož některé formy jsou schopny rychle hydrolyzovat

sarin a soman štěpením vazby P-F, jejich aktivita však podléhá individuální variabilitě (Kaliste-Korhonen et al., 1996; BRENDA, 2008).

Kreatinkináza a laktátdehydrogenáza jsou tkáňové enzymy. V mozku se nacházejí jejich izoenzymy v různých aktivitách u rozličných oblastí mozku. Vzestup obou enzymů v plazmě je interpretován jako tkáňové poškození, respektive poškození integrity buněk. Při otravě OF se na vzestupu sérových hladin podílejí i jejich izoenzymy typické pro mozkovou tkáň, což je způsobeno změnou propustnosti buněčné membrány a poruchou HEB (Gupta, 2004).

NO syntáza (NOS) je enzym produkující oxid dusnatý, signální molekulu, která se uplatňuje v řadě funkcí mozku a cév. Histochemický průkaz NADPH diaforázy v mozku je interpretován jako důkaz exprese neuronální NOS. Fyziologicky je zajímavý jak pohlavní rozdíl v aktivitě NOS tak fakt, že molekula NO difunduje z jedné buňky do druhé a zastává tak funkci takzvaného difuzibilního messengeru. Při otravě OF dochází k produkci nadbytku NO, což má souvislost s křečemi (Gupta, 2004).

2.2 Inhibitory a reaktivátory AChE

Inhibitory enzymů obecně mohou být rozděleny dle principu působení na tři typy – kompetitivní, nekompetitivní a alosterické. Inhibitory AChE se obvykle dělí dle místa vazby na molekulu enzymu (viz dříve) nebo podle síly vazby a schopnosti spontánní reaktivace. V následujícím textu jsou inhibitory členěny dle chemického složení.

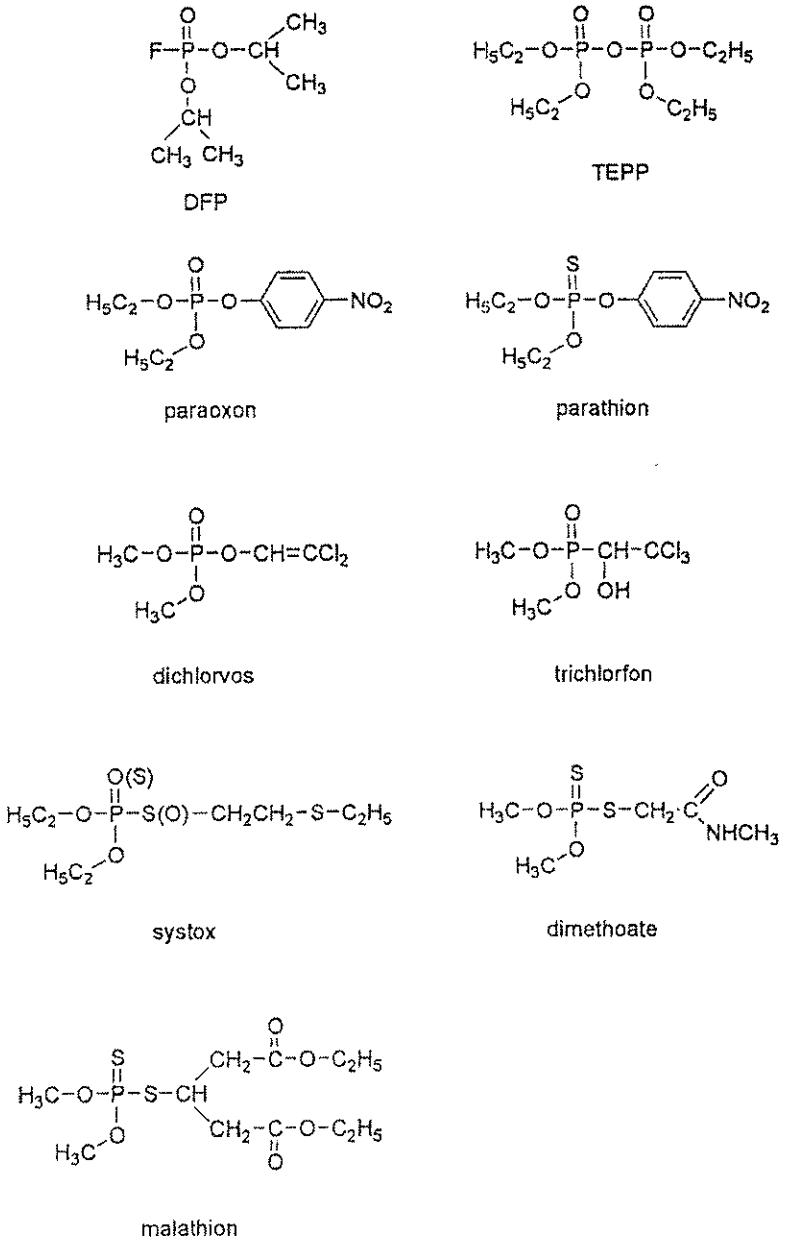
2.2.1 Organofosfáty

Organické sloučeniny fosforu obecně se vyznačují různými biologickými účinky (dráždivé, mutagenní, teratogenní, karcinogenní, nefrotoxické, pneumotoxické). Patří mezi ně i skupina tzv. organofosfátů (OF) čili organofosforových inhibitorů cholinesteráz. Jejich účinky se shodují s výše uvedenými, ale specifickým účinkem je zejména (i v nižších dávkách) 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 (BCHL), pro jejich biologický účinek se pro ně často používá označení nervově paralytické jedy či nervově paralytické látky (NPL) (Bajgar, 1985).

OF jsou látky kapalné nebo pevné, rozpustné málo ve vodě a dobře v organických rozpouštědlech, existují ale i hydrofilní OF. Po chemické stránce jsou to deriváty kyseliny fosforečné a lze je dále dělit do podskupin dle způsobu vazby uhlovodíkových řetězců na atom fosforu (Bajgar, 1985). Chemická struktura souvisí s toxickým účinkem. Záleží zejména na zbytku molekuly OF, který se odštěpuje při tvorbě komplexu na esteratickém místě AChE a který může blokovat anionická místa (Patočka et al., 1979). Chemické reakce OF v živém organismu mohou vést ke snížení účinku na organismus, ale také ke zvýšení toxického efektu, k čemuž dochází v případě oxidace thiosloučenin na oxosloučeniny (Bajgar, 2005).

Některé OF používané v současnosti jako pesticidy: DFP, TEPP, Paraoxon, Parathion, Dichlorvos, Trichlorofon, Systox, Dimethoate, Malathion (Bajgar, 2004).
Jiné starší preparáty dodnes dostupné a užívané v České republice: Actellic, Anthio, Basudin, Bladafum, Dimecron, Ekalux, Ekamet, Imidan, Instop, Metation, Phosdrin, Soldep, Wofatox, Zolone (Bajgar, 1985). Chemické vzorce vybraných OF jsou uvedeny na obr. 2.

LD_{50} při požití per os se např. u parathionu uvádí jako 50-200 mg pro 70 kg člověka, tj. 1-2 mg/kg, u DFP a stejnou bránu vstupu 0,3-1 mg/kg (Bajgar, 2004). Jediný OF přírodního původu je anatoxin a(S), jedná se o produkt sinic o LD_{50} 20 μg /kg (Maršálek, 2002).



Obr. 2. Chemické vzorce vybraných OF. Obrázek převzat z literatury: Bajgar, 2005

2.2.2 Nervově paralytické látky

Do skupiny OF patří i nervově paralytické látky (NPL) jakožto její nejtoxičtější zástupci. Zde jim je věnován samostatný odstavec, neboť tato práce je věnována především účinku NPL. Chemické vzorce NPL jsou uvedeny na obr. 3.

Dle vlastností NPL lze tyto látky rozdělit na tři skupiny:

a) G-látky - Tabun (O–etyldimetylamidokyanofosfát)

- Sarin (O–izopropylmetylfluorofosfonát)
- Cyklosin (cyklosarin, cyklohexylmetylfluorofosfonát)

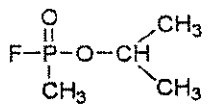
- Soman (O–pinakolylmetylfluorofosfonát).

Ve vojenské praxi i v odborné literatuře se také používá kódové značení: GA - tabun, GB - sarin, GD - soman, GF – cyklosarin (Shih et al., 2005). G-látky jsou bezbarvé, pohyblivé kapaliny, bez zápachu, relativně vysoce těkavé. Proto vstupují do organismu zejména respirační cestou. V terénu udržují toxicitu až 24 hodin. LCt_{50} po 1 min 0,03-0,08 mg/l. LD_{50} při zamoření kůže 0,7 – 7 mg/kg. Střední letální dávky uvedené v experimentální literatuře se mohou lišit dle čistoty roztoku, především ale tím, že jsou vztaženy k danému živočišnému druhu a způsobu aplikace.

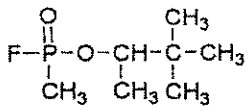
Soman dealkyluje nejrychleji, s poločasem 6 minut při 25 °C (Coult et al., 1966), pro srovnání sarin 10-12 hodin (Bartošová, 2006). Tím soman velmi omezuje použití reaktivátorů (viz odstavec 2.6.2 Problematika somanu). Je také nejvíce lipofilní, proto se nejsnáze dostane přes HEB a má nejsilnější účinek na centrální AChE (Prymula, 2002).

b) V-látky: VX (O–etyl-S-/2-diizopropylaminoetyl/ -metylthiofosfonát)
Ruská obdoba VX označena RVX, R33, SU - VX nebo VR (Bajgar, 2005; Bajgar, 2006; Shih, 2005). Existuje také čínská VX v literatuře značená jako CVX.
VX látka dealkyluje nejpomaleji, poločas dealkylace je řádově dny. Je to bezbarvá, méně pohyblivá kapalina, bez zápachu, díky nízké těkavosti vydrží v terénu velmi dlouho. Je rozpustná v organických rozpouštědlech, ve vodě je špatně rozpustná. Je lipofilnější než G-látky a toxičtější zejména při zasažení kůže. Po průchodu do organismu účinkuje velmi rychle hlavně na nervosvalové ploténky, takže jedinec zemře na akutní respirační insuficienci. Díky své nižší těkavosti se ovšem tato látka ke kůži dostává obtížně přes oděv. LCt_{50} po 1 min 0,036 mg/l. LD_{50} při zamoření kůže 0,07 mg/kg. LD_{50} při i.v. aplikaci pro člověka je vypočtena na 0,014 mg/kg (Bajgar, 1991).

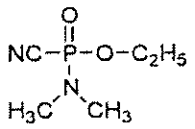
c) IVA látka (látka se střední těkavostí) – (dimetylamido–O-/2-dimetylamino-etyl/-fluorofosfonát). Je též označována jako GP či GV. Tato bojová chemická látka byla vyrobena jako kompromis ve snaze snížit nevýhodu VX látky, která se díky nízké těkavosti nedostane přes ochrannou výstroj, a nevýhodu sarinu, který má slabší účinky na kůži. Pro svou střední těkavost je tedy nebezpečná všemi branami vstupu. LD_{50} 1,36 mg/kg (Prymula, 2002).



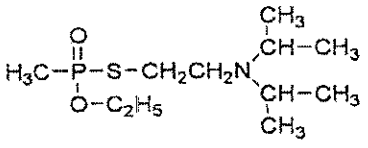
Sarin



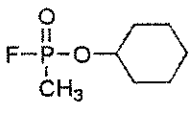
Soman



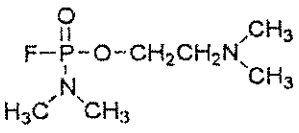
Tabun



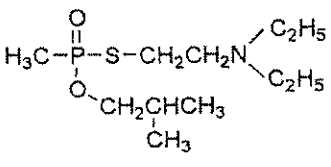
VX



Cyclosarin



GV



SU - VX

Obr. 3. Chemické vzorce NPL. Obrázek převzat z literatury: Bajgar, 2005

2.2.3 Karbamáty

Jako blokátory AChE se chovají také karbamáty. Inhibují též acylací (karbamylací) esteratického místa AChE, mají lepší spontánní reaktivaci (dekarbamylaci; poločas u metyl- a dimetyl derivátů 40 min), kterou však nelze urychlit terapeutickým podáním reaktivátorů (Patočka et al., 1979). Nejznámějšími přestaviteli jsou přírodní fyzostigmin (Eserin) a syntetický pyridostigmin. Pyridostigmin neprochází do CNS, nemá tedy centrální efekt (Bajgar, 2005).

U karbamátů i OF toxicita in vitro nemusí odpovídat působení in vivo. Pyridostigmin, ale také např. karbamát DMC, in vitro silný inhibitor AChE (méně BuChE), jakožto kvarterní sloučenina neprochází přes hemato-encefalickou bariéru (HEB). Tyto látky ovšem mohou působit na AChE bránice (Bajgar et Patočka, 1979).

Karbamáty i krátkodobé inhibitory uvedené v následujícím odstavci se mohou využít v profylaxi otravy NPL, kdy svým vlastním obsazením AChE krátkodobě ochrání její

molekulu před navázáním NPL. Při tom jeví parasympatomimetický účinek (Bajgar, 2005). Využití této skutečnosti omezuje fakt, že účinek těchto látek není stejný ke všem NPL, např. pyridostigmin má dobrý protektivní účinek proti otravě tabunem a somanem, ale ne vůči sarinu či VX (Anderson et al., 1992; Tuovinen et al., 1999).

2.2.4 Další inhibitory acetylcholinesterázy

Tzv. krátkodobé inhibitory cholinesterázy, které mají terciální dusík a přestupují HEB, jsou například: tacrin (Cognex), donepezil (Aricept), rivastigmin (Exelon), 7-methoxytacrin (7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridin = MTX) (Perry, 1998; Bajgar, 1991). Neváží se na esteratické místo, ale na γ-anionické místo AChE. Nejsou striktně selektivní, aby inhibovaly určitou vazebnou síť enzymu, t.j. G1,G2 nebo G4. Tím dojde ke zvýšení hladin prakticky ve všech oblastech CNS; a nejen to, koncentrace ACh se zvýší i v GIT (Perry, 1998). Tacrin, MTX, huperzin A a další látky díky své podpoře cholinergního účinku a nízké toxicitě se v posledních letech začaly používat pro léčbu Alzheimerovy choroby, která je způsobena nedostatkem ACh v mozkové kůře (Perry, 1998; Bajgar, 2005). O této problematice existuje velké množství recentní literatury. Přehledné shrnutí nabízí odstavec 2.4.12 Využití inhibitorů cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy choroby.

Schopnost blokovat aktivní povrch AChE mají též kationty kovů, inhibice je asi 1000x nižší než při použití G-látky. V experimentu in vitro byl prokázán největší inhibiční účinek u iontů rtuti, méně u kadmia a nejmenší inhibici jevil zinek (Bajgar, 1991). Jako inhibitory různých enzymů včetně AChE se chovají aziridiniové soli (Patočka et al., 2005). Aktivitu AChE bez podrobnější znalosti mechanismu snižují též cyklosporin A (Herink et al., 2003) a daunorubicin (Geršl et al., 1996).

Mezi histochemicky významné inhibitory cholinesteráz patří mimo fyzostigmin také organofosfáty diisopropylfluorofosfát (DFP) a tetraisopropylpyrofosforamid (isoOMPA) (Lojda et al., 1979). IsoOMPA se v experimentech používá jako selektivní inhibitor BuChE pro zjišťování aktivity AChE (Tryphonas et Clement, 1995), lze použít též ethopropazin či chinidinsulfát (ATSDR, 2003). Naopak pro inaktivaci AChE při průkazu BuChE látka BW284C51 či BW62C47 (Lojda et al., 1979; Stoward et Pearse, 1991).

2.2.5 Reaktivátory AChE

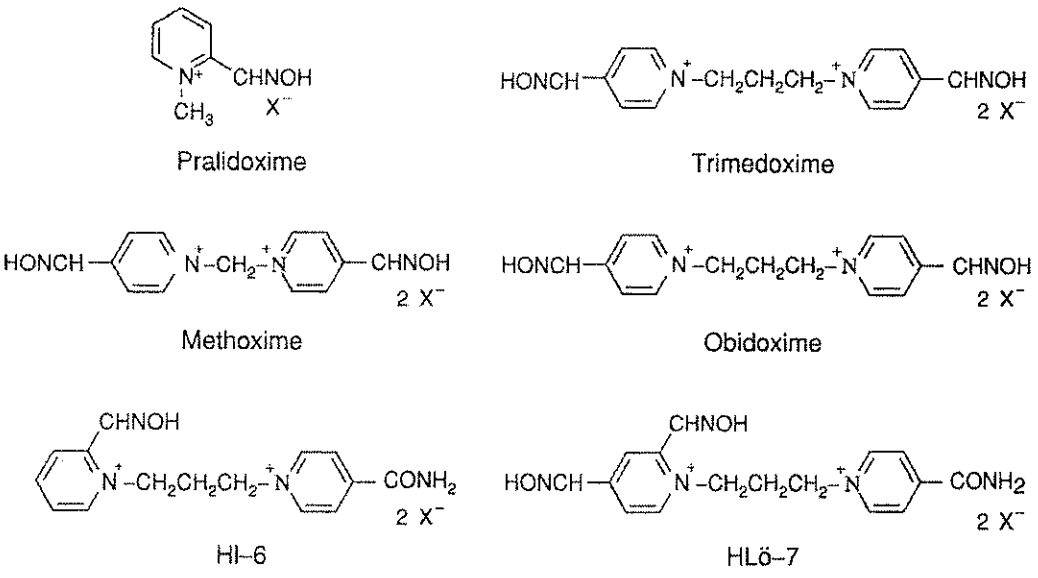
V protikladu k inhibitorům AChE, uvedeným v předchozích odstavcích, mají

reaktivátory AChE zcela odlišnou roli v patofyziologii otrav. Jedná se o syntetické látky, které jsou schopny reagovat s komplexem AChE - OF a obnovit aktivitu enzymu.

Chemická podstata všech užívaných reaktivátorů cholinesteráz je podobná, jedná se o oximy, které se liší počtem pyridiniových kruhů a polohou oximové skupiny. Chemické vzorce nejužívanějších reaktivátorů jsou uvedeny na obr. 4. Nejčastěji se dělí podle počtu dusíkových iontů na monokvarterní a biskvarterní. Představiteli jsou pralidoxim, trimedoxim, methoxim, obidoxim (Bajgar, 2004). Novější generaci představují tzv. H-oximy (HI-6, HLö-7), jsou to málo rozpustné látky, nestabilní ve vodním prostředí (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. Užívané preparáty a terapeutické postupy jsou popsány v části 2.4 Toxikologické a klinické aspekty. O vývoji a zkouškách nových oximů je psáno v části 2.6 Experimentální poznatky.

Reaktivace molekuly AChE spočívá v uvolnění chemické vazby mezi enzymem a OF. Reaktivátory nejsou účinné pro komplex enzym – karbamát. Jejich účinnost se může lišit k různým organofosfátům. Důvodem mohou být různé fyzikální, elektrostatické vlastnosti, stejně jako odlišnosti ve tvaru molekuly oximu. Například tabun je poměrně rezistentní vůči oximům, jedině obidoxim a trimedoxim díky výhodné konformaci reaktivují komplex AChE-tabun a dosahují mnohem vyšší účinnosti než nejnovější H oximy (Kassa, 2002a; Cabal et al., 2004). Obidoxim naproti tomu účinkuje na komplex AChE – VX až v toxických koncentracích a je zde proto nepoužitelný (Kuča et al., 2005).

Účinek reaktivátorů není omezen jen na reaktivaci AChE. Tyto látky se váží přímo na muskarinové receptory, ovlivňují uvolňování ACh jak na periferii, tak tak v CNS a působí i přes jiné necholinergní systémy, jako například GABA. Reaktivátory při koncentraci vyšší než 10^{-3} M způsobují hydrolýzu acetylthiocholinu, což je potřeba respektovat například při testech reaktivatelnosti cholinesteráz a při kvantitativně hodnocených experimentech (Patočka, 1973). Oximy jsou navíc samy o sobě relativně silné inhibitory ChE, ale řádově v minutách se z vazby uvolňují (Hackley et al., 1959). Jejich parasympatolytický vedlejší účinek není zcela objasněn, ale pomáhá při léčbě (Bajgar et al., 2007a).



Obr. 4. Chemické vzorce nejužívanějších reaktivátorů AChE. Obrázek převzat z literatury: Bajgar, 2004

2.3 Patofyziologie otravy OF a morfologické změny ve tkáních

2.3.1 Biologické účinky OF

Prvotní mechanismus toxického působení OF je inhibice AChE a BuChE. 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 parasympatomimetickými příznaky a svalovými křečemi (Bajgar, 2005). Účinky jsou podrobněji rozepsané v části 2.4 Toxikologické a klinické aspekty.

Závažnost účinku OF záleží na toxicitě a dávce daného organofosfátu a koreluje s mírou inhibice AChE. U nejtoxičtějších zástupců (G-látek a V-látek) se aplikací řádově 10-100μg/kg dosahuje inhibice na úroveň 5-30% aktivity AChE v krvi (Shih et al., 2005). Tyto dávky odpovídají LD_{50} a v mozku se jimi dosáhne 5% aktivity AChE, v některých oblastech dokonce 1% (kortex). Největší aktivita zůstává ve striatu, v případě VX 41% (Gupta, 2004).

Účinek G-látek a V-látek není stejný a i u jednotlivých zástupců se liší několika mechanismy, blíže popsanými v odstavci 2.4.2 Toxikokinetika OF. Z hlediska biologických účinků lze za hlavní rozdíl označit rozdílný účinek na centrální nervovou soustavu a na periferní nervovou soustavu a svalovinu. Rozdíl vyplývá s největší pravděpodobností z odlišné prostupnosti látek skrze HEB. Nejrychleji do mozku prochází tabun a soman, způsobují tak v organismu inhibici AChE s výrazným upřednostněním CNS. Na opačném pólu spektra stojí látky VX a RVX, které HEB procházejí jen pomalu a patrně právě proto se výrazně uplatňují v periferii na nervosvalové ploténce. Nejsilnější účinek na AChE v srdeční svalovině má soman. Přesné porovnání maxima a rychlosti inhibice AChE u jednotlivých zástupců G-látek a V-látek pro jednotlivé části centrální a periferní nervové soustavy provedl Shih (Shih et al., 2005). Signifikantní obnova aktivity AChE po otravě NPL se objevuje až po 24 hodinách a dostatečná je až po 7 dnech (Gupta, 2004). Obnova probíhá rychleji u fetů (Michalek et al., 1985) a je rychlejší u BuChE než u AChE (Gupta, 2004).

Organofosfáty však neinteragují přímo jen s cholinesterázami, ale také s nikotinovým a muskarinovým M2 receptorem pro ACh, pravděpodobně také cholinacetyltransferázou a vysokoafinitním přenosovým systémem pro cholin, s GABA-A receptorem, s neuronálními strukturáními proteiny, a dalšími makromolekulami (Gupta, 2004). Způsobují např. peroxidaci lipidů a poškozují tak buněčné membrány (Tonkopii, 2003), ovlivňují HEB (Antonijevic et al., 2003). Při vzniku křečí se předpokládá účast dalších excitačních neurotransmiterů, kdy nakumulovaný ACh funguje pouze jako spouštěcí faktor, který

odstartuje nerovnováhu mezi excitačními a inhibičními vlivy v mozku (Bajgar, 2005). Morfologické poškození nervové tkáně je zprostředkováno aktivací NMDA receptorů. NMDA receptory jsou přítomny na glutamátergních neuronech a následné nadměrné vyplavení glutamátu vede k silnému nahromadění vápniku v neuronech a k neuronální smrti (Bajgar, 2006). Souvislost mezi vznikem křečí a následným poškozením nervové tkáně při otravě NPL je experimentálně prokázána (Scremin et al., 1997; McDonough et Shih, 1997). Křeče se iniciují ve striatu a substantia nigra, a generalizují v limbickém systému, přičemž účinek je větší u látek s rychlou inhibicí AChE (typicky soman) (Pazdernik et al., 2001).

Kromě účinku OF na nervový a svalový systém lze popsat další toxické účinky:
- stresogenní (zvýšení ACTH, kortikosteronu, cAMP, cGMP, tyrosinaminotransferázy) (Kassa, 1998),
- oběhový (snížení srdeční frekvence a krevního tlaku, EKG abnormality),
- respirační (snížení dýchací frekvence a minutového objemu s následnými změnami dýchacích plynů) (Kassa et Fusek, 2002b),
- imunitní (zvýšení počtu leukocytů, snížení látkové i buněčné imunity),
- mutagenní (zásahem do nukleových kyselin, u NPL však neprokázán význam na mutace či karcinogenitu),
- natriuretický účinek, zvýšená peroxidace lipidů, zvýšení glukózy, laktátu a pyruvátu s následnou acidózou,
- změny enzymů a neurotrasmiterů (mechanismus je popsán výše): prokázáno zvýšení GABA a katecholaminů, z enzymů jsou zvýšeny také jaterní transaminázy (Kassa, 1998; Bajgar, 2004; Bajgar, 2005; Marrs et al., 1996).

2.3.2 Histopatologické změny

Jelikož OF nepůsobí jenom na molekulu cholinesteráz, ale mají komplexnější působení, prokazují se histopatologické změny v řadě orgánů. Tyto změny nejsou specifické pro organofosfáty, k podobnému poškození dochází při otravě jinými látkami (Greaves, 1990). Některé změny jsou detekovány i po subkonvulzivní dávce OF (Matoušek, 1979). K nejvíce sledovaným orgánům patří mozek a srdce.

V mozku soman způsobuje změny především v limbickém systému – nejvíce postihuje pyramidální buňky v CA1 a CA3 poli hipokampu. Dále působí v dorsálních jádrech thalamu a kortexu. Některé práce zmiňují též amygdalu, mediální jádra thalamu, corpus geniculatum mediale, bulbus olfactorius, piriformní a entorinální kortex, laterální septum (Scremin et al., 1997; Tryphonas et Clement, 1994; Carpentier et al., 1990). Méně jsou změny vyjádřeny

v substantia nigra a corpus geniculatum laterale. Poškození retiny nebylo prokázáno (Tryphonas et Clement, 1995). Změny zahrnují postupně během hodin až dnů mikrovakuolizaci neuropilu, hypertrofii astrocytů, ztrátu dendritických trnů (Carpentier et al., 1991) a nekrózu neuronů, perivaskulární hemoragie a po 3 dnech známky reparace tkáně (glióza, proliferace endotelií, ústup vakuolizace). K poškození buněk dochází změnou intracelulárních iontů po silné excitaci, která se přenáší z nervových buněk i na astrocyty díky hyperkalemickému extracelulárnímu prostředí. Důsledkem edematózních procesů je také dilatace komorového systému (Tryphonas et Clement, 1995).
Změny interferují s vazokonstrikcí způsobenou somanem, není jednoznačné, jak velkou roli při poškození tkáně hraje ischémie. Je prokázána také korelace s klinickým obrazem křečí, při nichž zvýšená nabídka ACh se uplatňuje jako spouštěcí mechanismus, na udržení křečí se pak uplatní spíše ischémie. Lokálně jsou křeče doprovázeny zvýšeným metabolismem v mozku (Tryphonas et Clement, 1995; Scremin et al., 1997). Vysvětlení ischemie neuronů je možné také změnou propustnosti membrány a intracelulárním edémem astrocytů, které pak nemohou plnit svoji vyživovací funkci (Grange-Messent et Bouchaud, 1994).

V srdci dochází k ložiskovému intersticiálnímu a perivaskulárnímu edému, hyperémii a k drobným krevním výronům ve svalstvu komor. Na srdci byly prokázány změny ve vnitřní části stěny levé komory včetně papilárních svalů. Byla popsána stadia hyperkontrakce, myocytolýzy a zánětlivé odpovědi s následnou reparací poškozené tkáně fibroblasty. Při otravě DDVP byly na srdci zjištěny nekrózy jak v srdeční svalovině tak v převodním systému (Parveen et Kumar, 2001). Myokardiopatie při otravě somanem je zřejmě nervového původu, účinkem mediátorů vegetativního systému. Vyplývá to i z ochranného účinku terciálních parasympatolytik (skopolamin, benaktyzin), která procházejí HEB, na rozdíl od kvarterních sloučenin (atropin). Postižení myokardu koreluje i s tíží záchvatů křečí a také se snižuje s podáním antikonvulziv (Tryphonas et Clement, 1993). Možným korovým okrskem, který má souvislost s poškozením srdce při otravě somanem, je kůra inzuly (Scremin et al., 1997).

Poškození kosterních svalů je charakterizováno nekrózami. OF způsobují nekrózy myofibril bránice zejména v blízkosti nervosvalových plotének, při subletální dávce degeneraci svalových vláken a mononukleární infiltraci (De Reuck et Willems, 1975; Bright et al., 1991).

V jaterních buňkách se objevují vakuoly, dochází k difuzní steatóze a v perisinusoidální zóně k fibróze (Satar et al., 2004). Změny v plicích vyjadřuje nález ložiskového edému a krevních výlevů do parenchymu plic. V ledvinách se rozvíjí syndrom lipoidní tubulární nefrózy. V tenkém střevu dochází opožděně k ložiskovému edému, ve

vrcholcích klků i k nekrózám. V nadledvinkách je sledována hyperémie ve dřeni. Tyto změny v orgánech jsou společné pro zástupce G-látek i V-látek (Urban et Lískovská, 1977).

V řadě orgánů dochází ke změnám mikrovaskularizace, viditelné na korozivních odlitcích v SEM, jako smrštění prekapilár nebo změny povrchu endotelií. Byly prokázány nejvíce v játrech, ale také mozku, nadledvince a dalších orgánech (Slížová et al., 1995).

2.3.3 Histochemické změny

Histochemické změny vyplývají z výše popsaného mechanizmu 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. Např. při otravě somanem se popisuje relativně homogenní pokles aktivity ChE v mozku, otrava sarinem vykazuje určitou selektivitu s maximem inhibice v pontomedulární oblasti a ve frontální kůře, zatímco u V-látek je inhibice nejvíce selektivní (Bajgar, 1991). Tuto heterogenitu lze částečně vysvětlit přítomností izoenzymů a jejich různou citlivostí k jednotlivým NPL (Bajgar et Patočka, 1979). Ze čtyřech globulárních forem AChE se v mozku vyskytují dvě, s rozdílnou intracelulární distribucí a rozdílnou citlivostí k OF. Membránově vázaná forma G4 je citlivější, a právě ta se patrně uplatňuje v cholinergním přenosu (Bajgar, 2004).

U zvířat otrávených 2x LD_{50} somanem byla 5 minut po intoxikaci dosažena mírná až kompletní inhibice. Mírná až střední inhibice byla nalezena v jádrech tuberculi olfactorii. Střední inhibice je v nucleus accumbens, v motorických jádrech hlavových nervů a v nuclei pontis. Střední až vysoká inhibice byla zjištěna ve striatu, v nucleus basalis amygdalae. Vysoká inhibice byla pozorována ve všech jádrech retikulární formace mozkového kmene a v některých jádrech thalamu, např. nucleus ventralis thalami. V jiných částech mozku např. v kortexu dochází prakticky k úplné inhibici.

U zvířat uhynulých po intoxikaci 2x LD_{50} somanem vzhledem k dalšímu vývoji otravy dochází ke střední inhibici AChE v nuclei olfactorii, v nucleus accumbens. Střední až vysoká inhibice AChE byla pozorována v nc. periventricularis hypothalami, nc. ambiguus, nc. dorsalis nervi vagi a nc. nervi hypoglossi. Kompletní inhibice AChE byla nalezena ve striatu, mediálních a septálních jádrech, ve většině jader hypothalamu, v mozečku, jádrech hlavových nervů, jádrech retikulární formace, v kortexu.

Rozdílný účinek jeví V-látky. U zvířat intoxikovaných 2x LD_{50} VX-látkou i.m. byla histochemicky prokázána velmi vysoká inhibice v kortexu, v mozečku, v retikulární formaci, v hipokampu, v amygdale, v jádrech septa, v některých jádrech mesencephalu, ve většině

jader hypothalamu a v ojedinělých jádrech thalamu. S tím kontrastuje mírný inhibiční účinek VX-látky ve striatu, jádrech tuberculi olfactorii, nc. accumbens, a jinde.

V motorických ploténkách mezižeberního svalstva a bránice u uhynulých zvířat po intoxikaci 2x LD_{50} somanem byla zjišťována vysoká inhibice AChE, v srdci kompletní inhibice AChE. Podobný obraz byl nalezen při intoxikaci supraletální dávkou VX (Urban et Lískovská, 1977).

Z toxikologického pohledu je upřednostňován poznatek, že kritickou hodnotu představuje snížení aktivity AChE v pontomedulární retikulární formaci (RF) pod 5% (Bajgar, 1991; Bajgar, 2004). Je zřejmá souvislost s kontrolou kardiovaskulárních parametrů a s přítomností dýchacích center v této oblasti. Respirační centra v pontomedulární RF jsou pod cholinergní kontrolou a jejich výpadek je považován za příčinu smrti. Přežití koreluje s aktivitou AChE v této oblasti (Kubin et Fenik, 2004; Bajgar et al., 2007a).

Při otravě inhibitory AChE je téměř ve všech případech (kromě uváděných NPL např. aldicarb, oxamyl, methomyl, carbofuran, metylparathion a další insekticidy a pesticidy) nejméně postižena aktivita AChE ve striatu. Striatum díky silné aktivitě svojí AChE nabízí nejvíce vazebných míst a zachovává si proto při otravě největší percentuální aktivitu na rozdíl např. od kortexu. V absolutních číslech ale má ale nejvíce obsazených molekul enzymu (Gupta, 2004).

2.3.4 Heterogenita CNS

V problematice otrav organofosfáty se setkáváme v mnoha aspektech s heterogenitou mozkových jader i heterogenitou účinku jednotlivých OF, které jsou blíže popsány na různých místech literárního přehledu. Pro krátké shrnutí:

1) Jednotlivá jádra a podjádra mozku fyziologicky obsahují nestejnoměrné množství AChE a BuChE všetně jejich izoforem, ChAT i acetylcholinových receptorů. Podobné tvrzení lze vztáhnout i na mezidruhové rozdíly, které ztěžují přenos experimentálních poznatků na člověka.

2) Inhibice AChE organofosfáty není rovnoměrná ve všech jádrech mozku, a není ani shodná pro všechny druhy OF a NPL. Při experimentech se rovněž bere v úvahu časový rozvoj inhibice AChE, který se liší u jednotlivých OF. Postižení jednotlivých jader mozku též vykazuje odlišnosti v závislosti na dávce subletální, letální a supraletální.

3) Také účinek reaktivátorů je heterogenní v jednotlivých oblastech mozku a je rozdílný ve vztahu k jednotlivým NPL (Gupta, 2004).

Tyto skutečnosti opravňují experimentátory využít k hodnocení účinku OF a jejich

antidot kvantitativní histochemii, která zároveň dává informaci o výši enzymové aktivity a zároveň detailně zobrazuje mozkovou tkáň.

2.4 Toxikologické a klinické aspekty

2.4.1 Toxické látky – definice pojmů

Toxické látky – jedy jsou takové látky, které po jednorázovém či opakovaném vniknutí do organismu vyvolají charakteristické změny, jež mohou vést až k smrti. Změny jsou dány interakcí s biologicky aktivní makromolekulou – bílkovinou nebo nukleovou kyselinou. Látka je účinná celkově, nikoliv lokálně (např. žíravina), zároveň se za toxické působení nepovažuje tepelné nebo mechanické poškození. Dávka vedoucí k poškození je nízká, přičemž velikost dávky potřebná k otravě, respektive ke smrti organismu, je pro každou látku vyjádřena toxikologickými konstantami. V tomto literárním přehledu jsou použity tyto pojmy, které vyjadřují toxicitu látek:

Střední letální koncentrace LCt_{50} – popisuje se u inhalačních otrav plyny nebo těkavými kapalinami. Je to taková koncentrace, která u 50% zasažených jedinců vyvolá po čase t smrt. Zpravidla je vztažena na 1 minutu. Vyjadřuje se v mg.min / m^3 prostoru.

Střední letální dávka LD_{50} – popisuje se u otrav kapalinami nebo pevnými látkami. Je to taková dávka, která u 50% zasažených jedinců vyvolá smrt. Vyjadřuje se v mg / kg hmotnosti.

Experimenty, které zjišťují účinek OF, jsou prováděny buď ve střední letální dávce (LD_{50}), subletální dávce vyvolávající křeče (konvulzivní dávka, např. 0,9 x LD_{50} somanu), subkonvulzivní dávce (obvykle 0,5 x LD_{50}) anebo naopak supraletální dávce (1,5 x LD_{50} či 2 x LD_{50}, využívá se zejména ke zjištění spolehlivosti antidot).

2.4.2 Toxikokinetika organofosfátů

Toxikokinetika OF je rozdílná dle typu organofosfátu. V cílové tkáni účinkuje 1-50% dávky, přičemž ztráty vznikají při resorpci (jde spíš o zpomalení průniku bariérami při jiném druhu podání než i.v.), transportu (vazbou na bílkoviny, ale i navázáním na plazmatické cholinesterázy) 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; ATSDR, 2003). Bylo zjištěno, že erythrocytární AChE je inhibována v závislosti na vstupu OF: při i.v. působí 100% dávky, i.m. 50-80%, i.p. 20-40%, p.o. 6-16%, p.c. 1-5% podané dávky (Bajgar, 1991). Toxickou dávku je proto možno vyjádřit ve vztahu k bráně vstupu, například toxická dávka většiny NPL při perkutánních otravách je vyšší než při otravách parenterálních nebo inhalačních. To je dáno nejen mechanickými ztrátami a

odpařováním noxy ze zamořeného povrchu, ale také schopností kůže a tkání, přes které NPL prostupuje, tyto látky vázat a enzymaticky je inaktivovat (Bartošová, 2006).

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. Depo se vytváří v kůži, erythrocytech, svalech a plicích a může se uvolňovat ještě po 24 hodinách. Nedochází zde k jeho inaktivaci, ale uvoňuje se odtud později opět jako toxická látka. Vzhledem k tomu, jak malé procento podané látky dokáže vyvolat toxický účinek, je jasné, že každé malé množství deponovaného somanu je velmi nebezpečné (Bajgar, 2004; Shih et al., 1996).

Mezi OF, které nejsou v organismu detoxikovány, patří V-látky, jež obsahují vazbu mezi fosforem a sírou. To je zřejmě důvod vyšší toxicity V-látek oproti G-látkám (Bajgar, 2005). Literatura navíc připouští možnost hydrolýzy V-látek se vznikem jiných toxických produktů (Shih et al., 2005). Ve srovnání se sarinem či somanem má VX také prolongovaný efekt. Inhibice AChE dosahuje 50% během minut při použití G-látek, zatímco u VX po více než 20 minutách (Bajgar, 2004). Při experimentu projevil sarin sníženou schopnost inhibice AChE, když byl po 20 minutách uvolněn turniket z exponované končetiny, na rozdíl od EDDM, který i po 20 min působil v plné dávce. Uvažuje se o proto hydrolýze sarinu plazmatickými fosforylázami („sarinázami") (Bajgar, 1991).

V toxikokinetice OF se významně uplatňuje problematika HEB. Důvodem je fakt, že tyto látky nejvíce ovlivňují právě nervový systém. Rozdílná struktura NPL je příčinou, že tyto látky vykazují různou průchodnost HEB. Rozdíly mezi G-látkami a V-látkami nejsou velké, přesto přispívají k různému rozložení účinku na periferní a centrální nervový systém. Existence HEB se uplatňuje i při léčbě. Oximy velmi špatně penetrují přes HEB díky své struktuře kvarterních pyridiniových solí. To omezuje jejich terapeutické užití. Přesto byla po otravě NPL a podání oximů prokázána reaktivace AChE v CNS. HEB omezuje použití i jiných léčebných látek, např. i atropinu. Mimo prostupnost NPL skrze HEB ovlivňuje distribuci NPL v mozku také prokrvení jednotlivých částí mozku a aktivita mozku v době expozice (Bartošová, 2006).

Poměrně složitá kinetika a dynamika OF se stále zkoumá. Byla prokázána např. rozdílná inhibice AChE při podání VX látky perorálním a parenterálním způsobem, nebo různé působení sarinu na různé molekulární formy AChE (Bajgar et Patočka, 1979).

2.4.3 Akutní otrava organofosfáty

Akutní toxický efekt je dán akutní cholinergní krizí, způsobenou fosforylací AChE, a následným rozvratem organismu. U některých OF následuje jako tzv. pozdní neurotoxický efekt (PNE) inhibice jiného enzymu - neurotoxické esterázy, také dochází k senzibilizaci receptorů pro ACh. Morfologické poškození nervové tkáně je dle posledních průzkumů zprostředkováno hyperstimulací glutamátergních neuronů prostřednictvím NMDA receptorů; toto poškození může přetrvávat léta po akutní expozici (Bajgar, 2006).

2.4.4 Akutní cholinergní krize

Klinicky v 1. fázi akutní otravy proběhne tzv. akutní cholinergní krize, která se vyznačuje tzv. cholinergními symptomy z akumulace ACh:

Muskarinové příznaky: parasympatomimetické projevy jako mioza, porucha akomodace, překrvení sliznice nosu a spojivky, slzení, slinění, pocení, zvýšená sekrece v horních i dolních dýchacích cestách, bronchokonstrikce, zvýšená peristaltika, tenesmy, poruchy mikce a defekace, snížení tepové frekvence a krevního tlaku.

Nikotinové příznaky na neurosvalové ploténce: postupující svalová ochablost, postupně s fascikulacemi až tonickými křečemi, končící jako paralýza. Vede k hypoventilaci a akutní respirační insuficienci.

Centrální příznaky z inhibice AChE v CNS: bolest hlavy, úzkost, emoční labilita, neklid, deprese, až koma při těžkých otravách (Bajgar, 1985).

2.4.5 Stupně akutní otravy

Klinické a laboratorní projevy akutní otravy závisí na tíži otravy, stejně jako doba latence objevení příznaků po expozici. Stupně akutní otravy lze tedy rozdělit dle tíže, která je výsledkem množství a druhu působícího OF, a které odpovídá laboratorní stanovení AChE a BuChE v erythrocytech, respektive v plazmě.

Co se týká množství, letální dávka se pohybuje řádově v g/kg (malathion) až mg/kg váhy (Paraoxon, Phorate) u běžně používaných insekticidů. V používaných ředěních znamená letální dávku vypití 50 - 500ml. Látky, které se využívají jako BCHL (sarin, soman, VX) mají toxicitu ještě vyšší a jejich střední letální dávka LD_{50} je rovna zlomkům mg/kg – viz odstavec 2.2.2 Nervově paralytické látky.

Latentní otrava (AChE, BuChE 70 - 90%) může proběhnout bez subjektivních obtíží. Objektivně může být přítomna mioza. Příčinou bývá obvykle profesionální otrava.

Lehká otrava (AChE, BuChE 30 - 70%) – muskarinové a centrální příznaky se

dostavují po latenci 10 min – 2 h. Subjektivně: bolesti hlavy, tlak a bolest v očích, úzkost, trnutí končetin, tíže na hrudi, bolest břicha, nevolnost, nucení na moč.
Objektivně: mioza, překrvení spojivek, zvýšená sekrece HCD, bledost, pocení, dušnost, dráždivý kašel s hlenem. Léčba lehké otravy má dobrou prognózu.

Střední otrava (AChE, BuChE 10 - 20%) – na rozdíl od předchozího stupně se zde objevují navíc nikotinové příznaky (fascikulace, křeče) do 1h. Nedochází k větším poruchám dýchacím, oběhovým a poruchám vědomí.
Subjektivně: stejné příznaky jako lehká otrava + napětí a bolest svalů (ústa, krk, dolní končetiny), dušnost, zvracení.
Objektivně: k symptomům lehké otravy se přidává nepravidelné dýchání, prodloužené exspirium, pískoty vrzoty, spíše bradykardie, hypotenze, cyanóza, pocení, tiky, křeče (negeneralizované s pauzami), zvýšený tonus a reflexy, poruchy řeči, excitace až útlumy a deprese, vědomí je zachováno.
Laboratorně: kromě změn AChE jsou registrovány též změny dýchacích plynů, extrasystoly. Středně těžká otrava vyžaduje delší dobu léčení i rekonvalescence.

Těžká otrava (AChE, BChE pod 10% i neměřitelná) – při inhalačním vstupu se příznaky otravy dostavují v minutách, při perkutálním po 30 až 60 minutách. Příznaky zahrnují vše co předchozí stupeň, otrava je navíc doprovázena intenzivní poruchou vidění, bolestmi očí a hlavy, dušností, kolikou, arytmií, silnou miózou. Dochází ke generalizovaným křečím s bezvědomím, až k paralýze. Dále bývá přítomna inkontinence, vyhasnutí reflexů, zástava dechu, kardiovaskulární selhání (Bajgar, 1985). Ke smrti tedy dochází z důvodu oběhového nebo respiračního selhání, v případě těžké inhalační otravy NPL během několika minut (Bajgar, 2005).
Laboratorně: mimo změny hodnoty AChE lze prokázat velké změny hodnot dýchacích plynů a acidobazické rovnováhy – např. base excess, pH. Zvýšená glukoza, zvýšená AST a další enzymy. V moči je přítomen nitrofenol jakožto metabolit OF.

V závislosti na vstupu se některé příznaky mohou vyvíjet zřetelněji:
- při perorálním podání především gastrointestinální příznaky a poškození jater, které ale může být dáno též účinkem vehikul – organických rozpouštědel, jež mohou tvořit až 80% objemu požité dávky;
- při inhalačním podání respirační příznaky, mióza, centrální příznaky a obecně rychlejší průběh otravy;
- při perkutánní cestě se dostavují spíš zažívací symptomy, otrava má pomalejší průběh;

- při vstupu spojivkou oční příznaky (Bajgar, 1985).

Přechodná fáze se někdy popisuje jako fáze vyznačující se přetrvávajícími cholinergními příznaky akutní fáze a necholinergními příznaky 2. fáze (Bajgar, 2005).

2.4.6 Opožděná fáze otravy organofosfáty

2. fáze je opožděná fáze akutní otravy: po překonání akutní respirační insuficience se rozvíjí kaskáda patofyziologických změn doprovázejících acidózu a rozvrat metabolizmu a projevujících se nespecifickými (necholinergními) příznaky.
Laboratorně se projeví snížením pO_2 a pH, zvýšením CO_2, glukózy, laktátu. Lze zaznamenat snížení hodnot draslíku a arytmie (Bajgar, 1985).

Komplikace jsou nespecifické (několik dní po expozici porucha srdečního rytmu a dýchání, zvýšené enzymy, sekundární infekce) a specifické – další cholinergní krize způsobená 2. vlnou vyplavení z tukového depa a oxidací OF (Bajgar, 1985).

Tzv. intermediate syndrom je popisován mezi akutní otravou a PNE a je charakterizován svalovou slabostí hlavových, dýchacích a končetinových svalů a snížením šlachových reflexů (De Bleecker et al., 1994).

Následné stavy po akutní intoxikaci se mohou objevit týdny až měsíce po intoxikaci a přetrvávat léta: psychické poruchy, neurocirkulační astenie, pocení a dermografie, zrakové poruchy, jaterní a ledvinové poruchy, poruchy krvetvorby (Bajgar, 1985). Podkladem části následných stavů je morfologické poškození nervové tkáně způsobené hyperstimulací glutamátergních neuronů – viz výše, odstavec 2.3.1 Biologické účinky OF.

2.4.7 Pozdní neurotoxický efekt

U některých OF proběhne zvláštní fáze otravy, která se přičítá inhibici jiného enzymu – tzv. neurotoxické esterázy. Jde o pozdní neurotoxický efekt (PNE), v anglicky psané literatuře OrganoPhosphate Induced Delayed Neuropathy (OPIDN) (Bajgar, 2004).
Typickým OF, který způsobuje PNE, je 3-O-kresylfosfát (TOCP) (Lotti, 1992). Dalšími látkami, které způsobují pozdní neuropatii při relativně nízkých dávkách, jsou Bromophos, Parathionmetyl a další. U NPL jako sarin či VX se popisuje PNE jen po přeléčených extrémně supraletálních dávkách (Munro et al., 1994).
Po latenci 1-4 týdny od akutní otravy některými OF se často i bez anamnézy akutní otravy (v 30-40% případů) objeví cholinergní příznaky s parézami (Bajgar, 1985).

Cholinergní fáze se dostavuje u 30% PNE a tkví v zvýšené sekreci v HCD, slzení, faryngitidě, laryngitidě. Můžou být přítomny křeče v končetinách, zejména v lýtkách.
Obrna periferních nervů může začít již po několika hodinách od cholinergní fáze, zhoršuje se během dalších dní, probíhá od distálních k proximálním svalovým skupinám. Postižení nervů se netýká senzitivního přenosu. Histologicky se projeví jako degenerace axonů a myelinu po 1-2 měsících, enzymaticky inhibicí a dealkylací neurotoxické esterázy. Denervace trvá po 2-6 měsíců, a může vést k těžké atrofii končetinových svalů. Rekonvalescence je velmi dlouhá, následky se mohou vyskytovat i po 10 letech (Bajgar, 1985).

2.4.8 Chronická otrava

Chronická otrava vzniká opakovanou slabou otravou, vedoucí ke kumulaci a senzibilizaci. Při větší expozici je pak letální dávka nižší (Bajgar, 1985). Početné studie jak na zvířatech, tak lidech vystavených expozici OF ukazují, že slabé dlouhodobé neurologické a neuropsychologické poruchy přetrvávají měsíce a léta po vystavení i nízkým dávkám NPL (Kassa et al., 2001; Benschop et De Jong, 2001).
Tento fakt někteří autoři dávají do souvislosti se souborem neuropsychologických příznaků, vyskytujících se u veteránů z války v Perském zálivu. Zmíněný syndrom se zapsal do povědomí odborné i laické veřejnosti pod názvem Syndrom Perského zálivu a zahrnuje bolesti kloubů, hlavy, malátnost, náladovost, výpadky paměti, nesoustředěnost, vyrážky, dýchací problémy a problémy v sexuální oblasti. Řada autorů ovšem existenci tohoto fenoménu zcela popírá nebo jej přisuzuje jiným příčinám než otravě NPL, například expozici zplodinám z hořících ropných ložisek, velkým dávkám chemoprofylaktik (antidot či bakteriálních vakcín), kontaktu s municí s ochuzeným uranem, psychotraumatu, či kombinaci uvedených příčin (Ferrari et Russell, 2001).

2.4.9 Diagnostika otrav NPL

Diagnostika:
1. Anamnéza – hromadné postižení, profesionální expozice
2. Klinické známky: pocení, bolesti hlavy, koliky, svalové bolesti, křeče, ztížené dýchání, mióza. Diferenciálně je třeba odlišit tetanie, epilepsii, intoxikaci kyanovodíkem a jinými křečovými jedy.
3. Laboratorní známky: snížení AChE v krvi, u některých OF přítomnost p-nitrofenolu v moči. Dále zvýšení počtu leukocytů, tkáňových enzymů v plazmě, zvýšená teplota. Další speciální testy jsou vyšetření volného OF a test reaktivovatelnosti ChE, který však není

možno použít při intoxikaci karbamáty (Patočka et al., 1973). Specificita či senzitivita dalších laboratorních testů je málo dostatečná (Bajgar, 2004).

Laboratorní stanovení aktivity AChE a BuChE odráží expozici OF a do jisté míry i inhibici AChE na synapsích (Bajgar, 1985). Korelace je vyšší pro erythrocytární AChE než pro plazmatickou BuChE (Bajgar, 1997; Worek et al., 1999). Nižší aktivita může být přirozeně u žen, ve stáří, při nízkoenergetických dietách, graviditě, uplatňují se i hormonální a další vlivy. BuChE, která je obvykle měřená, je snížena u poškození jater, diabetes mellitus, může být dána i genetickými odchylkami (Bajgar, 1985).

2.4.10 Terapie

Při první pomoci musíme zamezit pronikání dalšího jedu do organismu a udržet základní zdravotní funkce. Již v rámci lékařské první pomoci můžeme podat atropin (Bajgar, 1985).

V terapii otravy OF jsou používány dva základní terapeutické principy. Anticholinergika antagonizují efekt kumulovaného ACh na synapsích a reaktivátory cholinesteráz reaktivují inhibovanou AChE. U mírných otrav byla popsána i úspěšná léčba pouze atropinem a bikarbonátem (léčba acidózy) a zabezpečením řízené ventilace (Bajgar et Portmann, 2001). Jedním z názorů je, že léčba reaktivátory je nezbytně nutná až při akutní otravě 2x LD_{50} organofosfátu (Bajgar et al., 2007a).

Antidota – anticholinergika: *Atropin* i.m., i.v. 2-4 mg (u dětí 0,5-2 mg), případně opakovat po 10-30 min do zčervenání kůže a zvýšení tepové frekvence (mydriáza se projeví se zpožděním). Při akutní otravě není třeba bát se předávkování, celkově může podat během dnů desítky až stovky mg. V Armádě ČR je zaveden atropinový preparát CHONOL I. U středních otrav lze podat navíc *benactyzin* 3x2 mg per os pro snížení centrálních účinků a křečí. V armádě ČR je zaveden injekční preparát CHONOL II s benaktyzinem. Atropin špatně prochází přes HEB, benactyzin, biperiden či trihexyfenidyl mají proto lepší centrální účinek, zejména při otravě somanem (Kassa et al., 1996; Kassa et Samnaliev, 2004b).

Reaktivátory AChE pocházejí ze skupiny oximů, užívají se monokvarterní i biskvarterní oximy. Srovnání jejich účinku na různé NPL a vývin nových použitelných látek je dlouhodobým předmětem výzkumů na katedře vojenské toxikologie FVZ UO v Hradci Králové, o této problematice je šířeji pojednáno v části 2.6 Experimentální poznatky. Mezi starší užívané preparáty patří *pralidoximjodid, pralidoximchlorid, pralidoximmesylát* (PROTOPAM, CONTRATHION) 0,5-1 mg. Lze podat *trimedoxim* (TMB_4 nebo TMB_4 comp., který obsahuje navíc 2 mg atropinu) 250 mg i.v. pomalu. Nový trimedoximový

preparát nese název FOSAN. Trimedoxim však v současné době nemá ve výbavě žádná armáda na světě, ačkoliv dosahuje velmi příznivých účinků při otravě tabunem (Bartošová, 2006). Dále lze použít i.m. *obidoxim* (TOXOGONIN, TOKSOBIDIN, PIRRANGIT) 200mg. Pro první pomoc je k dispozici autoinjektor COMBO-PEN obsahující atropin a obidoxim (Bajgar, 2006). Další používaný oxim je *methoxim* (preparát RENOL). Starší generace oximových sloučenin se však špatně uplatňuje při otravě somanem pro jeho krátký poločas dealkylace (Kuča et al., 2005). Česká republika se podílela na vývoji a výrobě látky HI-6 (ANTIVA), která je zatím při terapii otravy somanem nejúspěšnější. Mezi další nové oximy s potenciální nadějí na uvedení do praxe patří HLö-7, HS6, HGG12, SAD128, BI-6. Antidotní terapie neovlivňuje jenom ireverzibilní inhibici AChE, ale též stresogenní účinek, zásah do metabolismu nukleotidů a zásah do imunitních funkcí (Bajgar, 1997).

Další terapeutické možnosti:

- antikonvulzivní terapie: opatrně krátkodobé barbituráty, benzodiazepiny (diazepam) (Bajgar, 1997). Benzodiazepiny se ukazují jako nejúčinnější, ačkoliv některá anticholinergika mají také antikonvulzivní efekt;
- „vychytávači" OF – injekčně podaná BuChE, karboxylesterázy;
- zvracení, výplach žaludku, hemoperfuze (u parathionu), hemodialýza, forsírovaná diuréza, peritoneální dialýza;
- resuscitace, zabezpečení oběhu a respiračních funkcí – např. *syntophyllin*, *mesocain*, *cardilan*, *isoprenalin*. Pro podporu srdeční funkce lze podat též nízké dávky *digoxinu*;
- snižování acidózy při opožděné fázi otravy – infuze bikarbonátu;
- antibiotika k prevenci infekce.

Látky, které nejsou doporučeny k podání: transfuze (měla by smysl jen v počátku jako vychytávač), centrální analeptika, fenthiaziny, myorelaxancia (Bajgar, 1985; Bajgar, 2006).

2.4.11 Profylaxe

Základní profylaxí je použití ochranných pomůcek - masek a ochranných oděvů. Masti mají minimální efekt. V armádě jsou rovněž používány detektory na chemickém nebo fyzikálním principu (Bajgar, 2006).

Je-li profylaxí míněna ochrana molekuly AChE v organismu, používá se v literatuře spíše termín pre-treatment, který označuje předpokládané pokračování léčby po zasažení organismu. Samotná farmakologická profylaxe bez léčby po expozici se v případě intoxikace NPL považuje za nedostatečnou (Bajgar, 2004). K ochraně AChE se používá podání reverzibilních inhibitorů cholinesteráz nebo karbamátů, dále tzv. vychytávače organofosfátů a

také profylaktické dávky reaktivátorů AChE.

Reverzibilní inhibitory AChE se naváží na molekulu enzymu a dočasně ji ochrání před atakem OF. Samy přitom sice snižují aktivitu, ale vzhledem k fyziologickému nadbytku AChE na synapsích nevede tato inhibice v aplikovaných dávkách k narušení přenosu nervových vzruchů. Krátkodobě inhibovaná AChE po uvolnění z reverzibilní vazby slouží při případné otravě OF jako zdroj aktivního enzymu. Nejpoužívanějšími profylaktiky z této skupiny jsou fyzostigmin a pyridostigmin. Fyzostigmin proniká přes HEB, ale má úzkou terapeutickou šíři a krátce trvající účinek (Bartošová, 2006).V praxi je proto nejvíce používán pyridostigmin. S vyšší dávkou roste jeho profylaktický účinek, ale také vedlejší účinky. Ty lze nejlépe omezit kombinací s anticholinergiky, užívaná je zejména kombinace pyridostigminu s benactyzinem a trihexyfenidylem (preparát PANPAL) (Bajgar, 1985; Bajgar, 2006). Další látky s podobným účinkem, které se zkoušejí, jsou aminostigmin, tacrin, MTX či huperzin A.

K profylaxi je možné použít i antidota (anticholinergika nebo reaktivátory). Profylaktické podávání antikonvulziv se neosvědčilo (Bajgar, 2004). Z reaktivátorů je pro tento účel nejlepší HI-6 s prodlouženou dobou působení. HI-6 je účinnou složkou unikátního českého náplasťového preparátu TRANSANT, který je nedráždivý, bez vedlejších účinků a působí relativně dlouho (8 hodin) (Doležal et al., 1988; Bajgar, 2004).

Podání látek, které v organismu zneškodní OF ještě dříve než se dostane do styku s AChE, lze označit jako detoxikaci. Tuto roli mohou plnit protilátky proti OF anebo enzymy, které OF rozloží či na sebe navážou. V současné praxi se používají především enzymy, které jsou schopny vázat OF. Označují se jako vychytávače nebo scavengers, výhodou jejich použití je absence vedlejších účinků (Bajgar, 2004). Fyziologickým vychytávačem je BuChE a někteří autoři považují tuto činnost za její biologickou roli (Glick et al., 2003). Bez ohledu na tento fakt je arteficiální podání BuChE jedním z nejvýhodnějších profylaktických postupů (Doctor, 2003). K humánnímu užití lze podat lidskou sérovou BuChE, purifikovanou nebo získanou z transgenních rostlin (rajčat) nebo transgenních zvířat (koz) – přípravek Protexia (Bartošová, 2006). Dávka 200 mg BuChE je považována za dávku dostatečnou pro profylaxi otravy $2LD_{50}$ somanu po dobu 3-5 dnů (Ashani et al., 1998).

2.4.12 Využití inhibitorů cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy choroby

V recentní lékařské literatuře jsou inhibitory cholinesteráz zmiňovány především pro možnost využití k léčbě Alzheimerovy choroby. Z toho důvodu zařazuji mimo téma práce i tento krátký odstavec.

Alzheimerova choroba je progredientní neurodegenerativní onemocnění, projevující se syndromem demence. Je definováno neuropatologickými nálezy, mezi něž patří především atrofie mozku, tvorba beta-amyloidu s formacemi plaků a selektivní zánik především cholinergních neuronů. Nejvíce bývají postiženy cholinergní neurony, projikující z nucleus basalis Meynerti do oblasti hipokampu a asociativních korových oblastí. Typicky je postižen presynaptický oddíl acetylcholinergního neuronu, kde ubývá ChAT a také presynaptických muskarinových i nikotinových receptorů. Postsynaptická část zůstává relativně intaktní, včetně postsynaptických receptorů a AChE, přesto však literatura uvádí pokles AChE, který koreluje s mírou demence v pokročilých stádiích nemoci, a změny v aktivitě mozkové BuChE (Fišar et Jirák, 2001; Giacobini, 2003).

Mezi symptomatickými léčebnými postupy k zmírnění průběhu lze využít i látek, které ovlivňují cholinergní systém. Je možnost podávat buď prekurzory ACh ve velkých dávkách (osvědčil se spíše lecitin než cholin), nebo muskarinové či nikotinové agonisty, ale v několika posledních letech se velmi ujalo především podávání reverzibilních inhibitorů AChE. Původně používaný fysostigmin je již zavržen pro svůj krátký poločas a vedlejší účinky. V současné době se používá tacrin, MTX, galantamin, donepezil, nebo rivastigmin (Wynn et Cummings, 2003; Williams et al., 2003). V některých zemích se zavádí do praxe huperzin A (Patočka, 1999).

Reverzibilní inhibitory cholinesteráz mohou být konečně využity i k léčbě demencí jiného druhu – vaskulární demence, demence při Downově syndromu a při demenci s Lewyho tělísky (Lewy body disease) (Giacobini, 2000). Parasympatomimetický účinek se využívá též např. při léčbě glaukomu (Somani et Dube, 1989).

2.5 Laboratorní metody průkazu aktivity AChE

2.5.1 Histochemický průkaz

Histochemie je metoda, která zaznamenala největší rozvoj v druhé polovině minulého století. Enzymová histochemie usuzuje na přítomnost a lokalizaci enzymu z výsledku jeho činnosti – na základě detekce produktu enzymatické reakce. Jedná se tedy o nepřímý průkaz. Produkt může být zviditelněn různými srážecími či syntetickými reakcemi.

K histochemickému průkazu AChE lze použít tyto metody:

1) azokopulační metody, vhodné pro AChE v erytrocytech. Používá se naftylacetát s diazoniovou solí za vzniku azobarviva.

2) metoda s thioloctovou kyselinou, při níž se činností enzymu uvolňuje sirovodík, který se s olovnatými ionty média sráží na sulfid olovnatý.

3) metody s acetylthiocholinjodidem jsou nejpoužívanější:

3a - dvouetapová metoda Koelle-Friedenwald: thiocholin uvolněný činností enzymu vytvoří s Cu^{2+} kationty bílou sraženinu – merkaptid. Ten se ve druhé etapě přemění žlutým sulfidem amonným na hnědý sulfid měďnatý.

3b – přímá metoda Karnovsky – Roots: thiocholin uvolněný činností enzymu, redukuje ferrikyanid na ferrokyanid, ten s Cu^{2+} ionty vytvoří nerozpustný hnědý ferrokyanid měďnatý. Výhodou této metody je, že lze využít inkubační doby k požadované intenzitě zbarvení, je méně artefaktů (Lojda et al., 1979). Barvení je stabilní, jako fixativum je vhodnější aceton než paraformaldehyd nebo ethanol, které snižují intenzitu zbarvení (Ma et al., 2001).

4) s myristoylcholinem dle Gomoriho, po přidání sulfidu amonného vzniká černá sraženina v místech aktivity enzymu (Stoward et Pearse, 1991).

Další možnost spočívá v zesílení acetylthiocholinové metody stříbrem dle Hendersona, pomocí dusičnanu stříbrného a thiosíranu sodného.

2.5.2 Metoda Karnovskyho a Rootse

Metoda Karnovsky-Roots v úpravě dle Lojdy předepisuje ze zásobních roztoků smíchat ve stanovených dávkách postupně acetylthiocholin jodid (substrát), octan sodný a kyselinu octovou (pufr k udržení pH kolem 5,5), citran sodný (zabrání reakci měďnatých iontů a ferikyanidu), síran měďnatý a ferrikyanid draselný (reaktanty pro vznik sraženiny). Činnost enzymu se projeví po 3hodinové inkubaci při 37 stupních (Karnovsky et Roots, 1964; Lojda, 1970).

Metoda detekuje acetylcholinesterázu i butyrylcholinesterázu, aktivita enzymu je

vyjádřena intenzitou zbarvení, odstín cihlově červený. Pokud se acetylthiocholin nahradí butyrylthiocholinem, prokazuje se BuChE. Pro přesnější odlišení aktivity obou enzymů se mohou použít selektivní inhibitory BuChE (ethopropazin, IsoOMPA, chinidinsulfát) (Tryphonas et Clement, 1995; ATSDR, 2003) či AChE (BW284C51 nebo BW62C47) (Hammond et al., 1996; Stoward et Pearse, 1991).

Pro zjištění intracelulární lokalizace lze využít elektronové mikroskopie. Vzhledem k tomu, že výše zmíněné sraženiny obsahují kovový prvek, jsou elektrondenzní a k zobrazení se tedy mohou použít stejná reagencia jako u histochemie. Příprava preparátů ovšem musí splňovat podmínky pro elektronovou mikroskopii, jako je přiměřená tloušťka řezů, fixace oxidem osmičelým apod. (Stoward et Pearse, 1991).

2.5.3 Biochemické metody

K detekci AChE aktivity se převážně používají biochemické metody, které nepodají 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. Substrátem je acetylthiocholin, jako pufr se použije např. TRIS-HCl (pH 7.6). Aktivní enzym štěpí substrát a vznikající thiocholin atakuje 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoát) (DTNB) a dává thionitrobenzoát (TNB). Jasně žlutý TNB se měří spektrofotometricky při vlnové délce 405 - 420 nm (Ellman et al., 1961). Pro odlišení aktivity AChE od BuChE lze stejně jako u histochemických metod použít selektivní inhibitory BuChE, např. chinidinsulfát (ATSDR, 2003; Eyer et Worek, 2000). Látka Triton X-100 užívaná v některých biochemických protokolech je surfaktant, umožňuje hemolýzu krvinek, lepší uvolnění enzymů do homogenizátu a tím lepší vystavení substrátu nitrobuněčným enzymům. Mírně ovšem snižuje aktivitu AChE (Structure Probe, 2006).

Při biochemickém stanovení aktivity enzymu se substrátu dodává takové množství, aby zabezpečilo kinetiku 0. řádu, čili aby se využilo plné kapacity enzymu. Hodnotu aktivity enzymu lze vyjádřit jako μmoly substrátu hydrolyzované za minutu času a vztažené na mililitr vyšetřovaného tekutého materiálu nebo na miligram tkáně, vlhké nebo suché. Z toho lze odvodit tzv. mezinárodní jednotky (1mezinárodní jednotka 1 U = 1 μmol/min na gram vlhké tkáně). V klinických laboratořích může být aktivita rovněž vyjádřena jako cat/l = 1 mol substrátu hydrolyzován za sekundu na litr roztoku (1 μcat/l = 60 U/l).

2.5.4 Další metody průkazu AChE

Další metody stanovení aktivity AChE jsou elektrometrické (Michel, 1949), potentiostatické (Patočka et Bielavský, 1975), titrimetrické (Nenner, 1970), fluorimetrické (Sasaki, 1964), radiometrické (Israel et Lesbats, 1987), měřením pH (Winter, 1960), a další. Žádná z těchto metod neposkytuje kvantitativní informaci in situ, ve vztahu k okolním strukturám (Bajgar, 2004).

Vyšetření AChE pomocí protilátek může být buď metodou typu immunoassay nebo imunohistochemickým vyšetření, kdy látky prokazujeme in situ. Metoda je jednostupňová nebo častěji dvoustupňová s protilátkou označenou radionuklidem či navázaným fluorescenčním barvivem. Za tímto účelem jsou dostupné komerčně vyráběné protilátky i pro vyšetření humánní AChE. Vyšetření tohoto „AChE proteinu" však nemusí vypovídat o katalytické aktivitě enzymu (Thullbery et al., 2005). Při tomto vyšetření se imunoreaktivita stejně jako enzymová aktivita ztrácí při zahřátí na 54°C. Naproti tomu po vystavení enzymu inhibitorům či trypsinu je imunoreakce zachována, zatímco enzymová aktivita klesá (Brimijoin et al., 1987). Immunoassay je vhodná ke kvantifikaci. Imunohistochemie obecně může být také kvantifikována, stejně jako v případě kvantifikace histochemie je však třeba zvážit systémové chyby a výsledek uvážlivě interpretovat. K vyšetření cholinergního systému lze využít i metodu hybridizace in situ pro zjištění přítomnost a lokalizaci mRNA pro AChE. Detekce se provede sondou z nukleové kyseliny označenou radioaktivním markerem nebo fluorescenčním barvivem (Miš et al., 1999).

Inhibici AChE v mozku způsobené NPL lze nepřímo odvodit z inhibice erythrocytární AChE v krvi, na základě prokázané korelace (Bajgar, 1991).

Účinek inhibitorů AChE na organismus lze sledovat i biologickým monitorováním in vivo. Účinek na kardiovaskulární oběh můžeme zjišťovat pomocí EKG, a dále zakanylováním pokusného zvířete a přímým měřením krevního tlaku a srdeční frekvence. Parametry ventilace (minutový respirační objem a dýchací frekvenci) lze monitorovat kanylací trachey a napojením na pneumotachygraf (Kassa et Fusek, 2002b). Vstupní bránou agens v experimentu je obvykle podání i.m. nebo s.c., ale lze použít i box s odpařováním, neboť inhalační vstup spíše odpovídá reálné otravě sarinem a dalšími těkavými tekutinami (Ševelová et al., 2003).

2.5.5 Kvantifikace histochemických metod

Biochemické metody prokazují aktivitu enzymu po homogenizaci tkáně a centrifugaci,

umožňují přesné kvantitativní hodnocení aktivity, neumožňují ale přesně určit lokalizaci. Zpřesnit cílení částečně umožňuje provedení pukční biopsie. Ale ani nejlepší takové vzorkovací metody nejsou schopny postihnout mozkovou regionální a buněčnou heterogenitu (Hammond et al., 1996).

Z toho důvodu se v posledních letech hledají 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: standartní 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).

Ačkoliv histochemie jako metoda je známa již řadu desetiletí, její kvantifikace byla dlouhou dobu na okraji zájmu histochemiků. Důvodem byly nedostatky a limitující faktory metody (viz dále) a nedostatečné technické zázemí. Pozornost k sobě spíše poutala imunohistochemie, charakteristická vysokou specificitou. Z počátku i chyběl důvod rozšíření kvantitativní histochemie a ta se omezila na diagnozu patologických stavů, kde jiné metody neuspokojovaly, či ověření účinků léků, které tyto patologie vracely do normálu (Stoward, 1981). Histochemie se tedy pohybovala na „semikvantitativní" úrovni, kdy se výsledek hodnotil ve třech nebo čtyřech stupních. S konstrukcí mikročipu se vyvinula technika, která umožnila kvantifikaci zpřesnit.

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 přírůstkem produktu za časovou jednotku, je úměrná koncentraci aktivního enzymu (Lojda, 1970).

I při dodržení všech podmínek je reprodukovatelnost výsledků horší než u biochemických metod (Hammond et al., 1996).

Vlastní hodnocení získaného histochemického preparátu není dnes limitující díky rozvoji digitální techniky. Ke kvantifikaci histochemických metod je možno použít složité i relativně jednoduché systémy s podobnými výsledky:

- mikrodensitometrie (Storm-Mathisen, 1970),
- densitometrie s použitím scanneru, kde software zobrazuje aktivitu v 12 stupních šedi a umožňuje ji převést na tzv. pseudobarvy (Ma et al., 2001),
- mikrofotometrie (Kugler, 1991),
- mikroskop s CCD kamerou a software vyvinutý pro snímání densitometrii elektroforézy (Hammond et al., 1996),
- mikroskop s připojeným digitálním fotoaparátem a s běžným software pro digitální analýzu obrazu (Ruiz-Torner et al., 2001).

Všechny tyto metody 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 nepřímo úměrně převáděna na napětí, tato hodnota je potom přiřazena každému bodu (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.

Barevný obraz vzniká současnou informací ve třech barevných kanálech – zvlášť pro červenou, modrou a zelenou (RGB mód). Výsledná barva vzniká aditivním složením červeného, zeleného a modrého kanálu, informace potřebná pro jeden pixel má tedy standardně 24 bitů.

Statistické rozložení hodnoty jasu (denzity) všech pixelů v obrazu se nazývá histogram. Barevný obraz má tři histogramy – jeden pro každý barevný kanál (Hozman et al., 2006).

Pro účely kvantifikace histochemického preparátu je možno převést získaný barevný obraz do 256 stupňové šedé škály a pomocí software s jednoduchou analýzou digitálního obrazu získat histogram a průměrnou hodnotu pixelu v ohraničené oblasti obrazu. Pokud je preparát tmavší díky vyšší přítomnosti reakčního produktu, potom může nižší průměrná hodnota pixelu (vyšší tmavost) vyjádřit aktivitu enzymu v dané oblasti (Ruiz-Torner et al., 2001). Tento princip se může uplatnit při porovnávání preparátu s inhibovanou AChE oproti kontrolnímu preparátu za dodržení stejných podmínek pro výrobu histochemického preparátu.

Citovaní autoři se shodují, že histochemie AChE v mozku je dostatečně vhodná pro seriózní kvantitativní vyšetření včetně posouzení toxického efektu.

2.6 Experimentální poznatky

2.6.1 Laboratorní potkan jako model pro otravu organofosfáty

Laboratorní potkan kmene Wistar je nejvyužívanější model pro otravu OF, zejména, zkoumáme-li účinky na centrální nervovou soustavu. Potkan má větší mozek než myš, což lze využít pro lepší orientaci, dokonce pro stereotaxi. Cena a nároky na chov jsou přitom nižší než u psů, opic nebo prasat, na kterých dle literárních údajů též probíhala řada experimentů s OF. Jistou roli hraje možná i případná negativní reakce veřejnosti při použití tzv. středně velkých savců. To vše platí jak pro experimenty biologické, tak pro ty, které používají morfologický přístup (Paxinos et Watson, 1987).

Z těchto důvodů vytvořili Paxinos a Watson stereotaktický atlas potkaního mozku, který je v recentních experimentech standardně používán. Vyšli při tom ze starších podobných atlasů Königa a Klippela (König et Klippel, 1963) či Pellegrina a Cushmana. Pro studium rozložení AChE je velmi příznivá skutečnost, že autoři si k mapování jader mozku vybrali právě histochemický průkaz AChE. Stereotaktické souřadnice u frontálních řezů se odkazují na pozici bregmatu a na interaurikulární čáru, odpovídají potkanům Wistar o hmotnosti 270 – 310 g. Tím, že je atlas univerzálně používán pro výzkum morfologie mozku, má jistou zásluhu na sjednocení názvosloví. Specifikem rychle se rozvíjející neuroanatomie byla totiž nejednotnost názvosloví v různých pracech, množství synomym, eponym a rozdílných členění jader (Paxinos et Watson, 1987).

Veškerá experimentální data ze zvířecího modelu je potřeba uvážlivě aplikovat na lidský organismus z důvodu odlišné fyziologie, toxikodynamiky, toxikokinetiky i odpovědi na terapii. Například u laboratorních potkanů tvoří poměr AChE ku BuChE v krvi 71:29, zatímco u člověka 90:10 (Bajgar, 1972b). Karboxylesteráza, která funguje jako vychytávač toxinů, je oproti hlodavcům u člověka v minimálním množství (Bartošová, 2006). Účinnost oximových reaktivátorů při otravách jednotlivými NPL se liší u různých živočišných druhů, což vyžaduje opatrnost při extrapolaci těchto dat na člověka (Worek et al., 2002). Toxicitu některých NPL pro člověka lze odvodit ze srovnání inhibice mozkové či krevní AChE různých laboratorních zvířat a člověka in vitro a současně letálního účinku NPL na pokusná zvířata in vivo (Bajgar, 1991). Podobnými experimenty lze aplikovat i toxikokinetická data z pokusných zvířat na člověka (Bachmann, 1989). V literatuře jsou i ojedinělé toxikologické pokusy s NPL na lidských dobrovolnících, ale je třeba považovat je za značně riskantní a zůstat při experimentálních modelech (Marrs et al., 1996; Bajgar, 2004). Výjimkou jsou práce, které hodnotí průběh léčby u náhodných otrav lidí, což připadá v úvahu

spíše u relativně nízce toxických OF používaných jako pesticidy (Balali-Mood et Shariat, 1998).

2.6.2 Problematika somanu

Z hlediska terapeutických možností představuje soman nejzávažnější NPL. Ačkoliv jeho toxicita je srovnatelná se sarinem či ostatními G-látkami, účinek antidotní terapie současnými i perspektivnimi látkami není uspokojivý. Příčinou je dealkylace (stárnutí, ageing) komplexu somanu s molekulou AChE, která je popsána výše a která znemožňuje působení reaktivátorů. Pro soman je charakteristické, že ageing probíhá velice rychle, s poločasem asi 6 minut (viz odstavec 2.2.2 Nervově paralytické látky). Původní aktivita AChE se potom obnoví až po syntéze enzymu de novo, což je v mozku asi 50 dní, v erythrocytech, které nemají schopnost syntézy, až po 100 dnech nahrazením novými erythrocyty (Lüllman et al., 2002). Reaktivace trimedoximem in vitro v humánních erythrocytech i in vivo u krevní AChE psa ukázala procentuálně malou úspěšnost v případě somanu (Bajgar, 1991). Z praktického hlediska se pro účinné podání reaktivátoru považuje hranice 5 minut po vstupu somanu (Bajgar, 1985; Bajgar, 2005).

Nejúčinnějším známým oximovým reaktivátorem pro otravu somanem je zatím HI-6. Ačkoliv se obtížně dostává přes HEB, a má tedy nižší reaktivační efekt v CNS oproti periferii, vykazuje kromě reaktivace acylované AChE řadu dalších terapeutických mechanismů – například přímý antimuskarinový efekt, inhibici uvolňování ACh, zpomaluje dealkylaci komplexu AChE-soman. Dále má pozitivní účinek na kardiovaskulární a respirační systém a nízkou toxicitu. Tyto účinky HI-6 mimo samotnou reaktivaci mohou významným způsobem přispět k přežití intoxikovaných zvířat (Van Helden et al., 1996). Nejúčinnější je kombinace HI-6 s benaktyzinem (Kassa et Fusek, 2002b). HI-6 v experimentech na myších zvyšuje hodnotu LD_{50} somanu až 3krát, ani tato hodnota toxikology stále neuspokojuje (Kassa, 1997a). Lepší účinek nemají žádné starší oximové preparáty, jako perspektivní se může jevit reaktivátor HLö-7.

2.6.3 Použitelnost antidot

Řada experimentů se pokoušela porovnat účinnost léčby či profylaktického podání oximů proti jednotlivým NPL. Pro úspěšnou profylaktickou léčbu je předpokladem, že by měla poskytnout mnohem lepší výsledky než postexpoziční terapie. Výsledky jsou posuzovány in vitro i in vivo. Výhodou metod in vivo na zvířatech je možnost studovat působení jedu na různé tkáně, zejména na nervovou soustavu, včetně biologických parametrů,

výhodou metod in vitro je možnost opustit zvířecí model a pracovat s lidskou krví.

Z experimentů in vitro na mozkových homogenátech laboratorního potkana vyplývá, že na AChE inhibovanou VX látkou působí lépe H-oximy (HI-6 a HLö-7) než obidoxim, který účinkuje až při toxických koncentracích, či pralidoxim. Látka HI-6 a v pořadí druhá HLö-7 jsou úspěšnější rovněž při reaktivaci AChE s navázaným sarinem. U cyklosarinu jednoznačně dominuje úspěšnost HI-6. Jiná situace je v případě intoxikace tabunem, kde H-oximy jsou málo účinné díky tvaru své molekuly. Nejsilnějším reaktivátorem zde zůstává obidoxim či méně užívaný trimedoxim (Kuča et al., 2005; Kassa, 2004a). Obidoxim při vysokých dávkách je však hepatotoxický a je pravděpodobné, že tento účinek se může spolupodílet na letálním konci (Balali-Mood et Shariat, 1998). V případě RVX má vedle HI-6 příznivý účinek také methoxim (Kuča et al., 2006). Pro reaktivaci AChE na nervosvalové ploténce bránice v pokusu in vivo byla nejúčinnější kombinace HI-6 + atropin (pro sarin) a HLö-7 + atropin (pro soman a cyklosarin) (Kassa, 2002a).

Látka HI-6 byla účinnější 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., 1997b). HI-6 se přisuzují další benefity (viz odstavec 2.6.2 Problematika somanu), je nejúčinnější vůči „problematickému" somanu, při otravě tabunem je však dostatečně účinná až při vysokých dávkách. Má slabší efekt při intoxikaci pesticidy (Worek et al., 1996). Žádný z nejvíce experimentálně užívaných oximů tedy není dostatečně efektivní při otravě jakoukoliv NPL, tzn. že dosud neexistuje žádný širokospektrý reaktivátor (Dawson, 1994; Bajgar, 2004). 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.

Vývoj nového reaktivátoru AChE zahrnuje několik kroků: molekulární design, předpověď biologicky aktivní struktury reaktivátoru, syntéza, in vitro a in vivo evaluace schopnosti působit proti akutní otravě NPL (Kassa et al., 2005b). Jedním ze světově uznávaných pracovišť je v tomto ohledu Katedra vojenské toxikologie FVZ UO v Hradci Králové. V nedávné době zde byly připraveny například biskvarterní oxim BI-6, relativně dobře účinný proti somanu (Bielavský et al., 1998; Kassa et Cabal, 1999), či oximy, které jsou účinné proti tabunu – K027 (Kuča et al., 2003a) a K048 (Kuča et Kassa, 2003b) s prokázaným účinkem in vitro i in vivo (Kassa, 2005a). Řada alternativních oximů se ukazuje být v některém ohledu účinnější než dosud používané, ale žádný natolik, aby byl již uveden do klinické praxe (Bajgar, 2004; Hammond et al., 2003).

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. Tato problematika se stále zkoumá (Eyer, 2003). Je totiž prokázán vstup oximů do CNS za určitých podmínek, pravděpodobným mechanismem je poškození HEB organofosfáty při otravě (Petrali et al., 1991). Prostup oximů skrze HEB byl však prokázán mikrodialýzou i bez předchozího narušení integrity a funkce CNS (Sakurada et al., 2003). Ačkoliv u různých oximů se data liší, za účinnou plazmatickou koncentraci pro reaktivaci AChE in vivo je považována hodnota 4 μg/ml. Vzhledem k tomu, že oximy jsou samy o sobě toxické, je třeba uvážit výši dávky a opakování jejího podání. U laboratorního potkana se LD_{50} při i.m. podání oximů pohybuje od 480 μmol/kg pro obidoxim po 2280 μmol/kg pro HI-6 (Kassa, 2002a). Reaktivátory lze proto charakterizovat hodnotou SR (safety ratio), která je dána poměrem letální dávky oximu a reaktivační schopnosti oximu (Kassa et Cabal, 1999).

2.6.4 Další nezodpovězené otázky

Vědci se dlouhou dobu zaměřovali na působení OF na cholinergní systém, teprve poslední dobou se však odhaluje vliv OF na další mediátory. Ani ve fyziologii cholinesteráz není dosud objasněno vše, například jaké jsou funkce BuChE a erythrocytární AChE. Není vysvětleno, jakým mechanizmem a za jakých podmínek prostupují oximová antidota do mozku. Zbývá zodpovědět řadu otázek ohledně otravy stereoizomery OF, vstupu OF do organismu různými cestami, či dlouhodobých expozicí nízkými dávkami OF (Bajgar, 2004). V předchozích dvou odstavcích byla diskutována nevyřešená problematika antidota proti somanu.

Zodpovědět na tyto otázky patří mezi úkoly, před nimiž biologové a toxikologové v současnosti stojí. Není v silách jednoho pracovníka ani v silách jednoho pracovního kolektivu řešit všechny tyto zmíněné mezery v poznání. Zaměřili jsme se tedy na takové, které je možné řešit pomocí morfologických metod, a stanovili jsme si následující cíle práce.

3. Cíle práce

Na základě studia literárních pramenů jsme se rozhodli vypracovat metodu, která by byla schopná posoudit efekt vysoce účinných organofosfátů morfologickým přístupem.
K metodě kvantitativní enzymatické histochemie nás vedly tyto skutečnosti:
- cílovou strukturou působení OF je molekula enzymu AChE;
- klinický obraz, resp. přežití jedince koreluje s aktivitou / inhibicí tohoto enzymu;
- antidota a profylaktika se vyznačují obnovou, resp. ochranou enzymatické aktivity AChE, což se klinicky projeví zlepšením patologického stavu oproti neléčené intoxikaci.

Stanovení změn AChE tedy nejlépe odráží závažnost otravy OF stejně jako účinek terapie antidoty.

Množství autorů se zabývalo stanovením aktivity acetylcholinesterázy kvantitativní histochemií nebo podobnými metodami, které enzym detekovaly in situ a podaly přitom informaci o jeho aktivitě ve více než trojstupnové škále. Řada z nich označila kvantitativní histochemii jako vhodnou pro stanovení AChE (Ma et al., 2001). Někteří autoři použili tuto metodu i k studiu relativně málo toxických organofosfátů, používaných jako pesticidy (Hammond et al., 1996). Uvedená metoda nebyla ale použita pro nejtoxičtější zástupce organofosfátů, navzdory jejich společenskému významu a možnému dopadu v ozbrojeném konfliktu. Tato mezera v odborné literatuře je patrně způsobena obtížnou dostupností nervově paralytických látek mimo vojenský sektor. Předpokládali jsme, že kvantitativní histochemie může být použita i pro ověření nejsilnějších inhibitorů AChE a stejnou měrou i pro ověření účinnosti látek, které zabraňují toxickému účinku NPL. Jako příznivá se jevila možnost spolupráce s Katedrou toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví UO v Hradci Králové, kde jsou pro experimentální účely dostupné jak samotné NPL, tak i látky s profylaktickým účinkem či antidota. A co více, některá antidota jsou zde přímo vyvíjena a de novo syntetizována.

Za cíl jsme si tedy stanovili:

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 reaktivace 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

4.1.1 Zvířecí model

Inhibice AChE v mozku a na nervosvalové ploténce bránice byla studována histochemicky na zvířecím modelu laboratorního potkana. Pro naši práci jsme vybrali laboratorní potkany kmene Wistar o hmotnosti 200-220 g zakoupené od firmy BioTest, s.r.o., Konárovice, ČR. Zvířata byla chována v klimatizované místnosti za teploty 22±2 °C a 50±10% relativní vlhkosti, za světla od 7 do 19 hodin a při volném přístupu k pitné vodě. Zvířata byla umístěna v centrálním viváriu Fakulty vojenského zdravotnictví pod veterinární kontrolou. Experimenty byly zaštítěny povolením etické komise Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové.

4.1.2 Chemikálie

Nervově paralytické látky v čistotě minimálně 98% získala katedra toxikologie FVZ UO z Vojenského technického ústavu v Brně. Použité látky ze skupiny oximů byly syntetizovány na katedře toxikologie FVZ. Huperzin A a laboratorní chemikálie jsou produkty Sigma-Aldrich.

Před každým experimentem s NPL bylo na katedře toxikologie provedeno orientační určení toxicity, jehož účelem bylo ověřit, zda podávaná dávka opravdu odpovídá LD_{50} látky. Pro toto ověření bylo použito 3-5 laboratorních potkanů, kteří již nebyli zahrnuti do samotného experimentu.

4.1.3 Experimentální intoxikace a zpracování biologického materiálu

Zvířata byla otrávena vždy dávkou LD_{50} agens i.m., není-li výslovně uvedeno jinak. Kontrolní skupině byl aplikován fyziologický roztok. Vzhledem ke standartním toxikologickým postupům byly u intoxikovaných potkanů sledovány vegetativní příznaky, křeče a změny chování. Přeživší jedinci byli po 30 minutách usmrceni. Po dekapitaci byly vyjmuty mozky, příčně překrojeny na 2–4 části a rychle zamraženy. Tyto tkáňové bloky nebyly fixovány chemickými činidly, ale bez fixace krájeny na kryostatu na frontální řezy o tloušťce 20 μm. Tyto pravé kryostatové řezy se přikládaly na podložní sklíčko předem ošetřené kamencovou želatinou. Teprve potom se řezy vyjmuly z kryostatu a fixovaly

v parách formolu 1 min. Fixace pokračovala v Bakerově roztoku 5 minut, poté byly řezy opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do inkubačního roztoku.

Bakerův roztok je stabilizovaný fixační roztok, vhodný pro histochemii. Připravujeme jej podle Vacka (Vacek, 1972) tak, že komerčně dodávaný formalin nejprve protřepeme s uhličitanem vápenatým k neutralizaci kyseliny mravenčí. Vzniklá sraženina klesne ke dnu a dále použijeme slitou tekutinu. Pro přípravu 1 litru Bakerova roztoku smícháme 100 ml tohoto slitého formolu, 900 ml pramenité vody a 10 gramů chloridu vápenatého. Chlorid vápenatý stabilizuje roztok tím, že zabraňuje další tvorbě kyseliny mravenčí a udržuje tak konstantní pH.

4.1.4 Histochemické vyšetření

Histochemické vyšetření spočívalo v simultánní histochemické detekci AChE dle Karnovskyho a Rootse s detekcí alkalické fosfatázy (AP).

Metoda Karnovsky-Roots dle Lojdy (Lojda, 1970) předepisuje ze zásobních roztoků smíchat postupně tyto látky:

- acetylthiocholin jodid 25 mg
- destilovaná voda 5 ml
- 0,82 % octan sodný 31,6 ml
- 0,6 % kyselina octová 1 ml
- 2,94 % citran sodný 3 ml
- 0,75 % síran měďnatý 5 ml
- 1,165 % ferrikyanid draselný 5 ml

Uvedené dávky jsou vztaženy na 1 kyvetu pro 10 skel.

Řezy jsou inkubovány 3 hodiny při 37 stupních Celsia. Po vyjmutí z inkubátoru se řezy opláchnou destilovanou vodou. Řezy se ještě nechají přes noc ve vodě s formolem a poté zamontují do glycerínové želatiny.

Inkubaci dle metody Karnovskyho a Rootse předcházela ještě detekce AP podle Lojdy (Lojda, 1970). Postup: zfiltrovali jsme 5 mg naftol AS-MX fosfátu rozpuštěného v dimetylformamidu a přidali 10 mg Fast blue BB v 12,5 ml Tris-HCl (pH 9,2). Uvedené dávky jsou na 1 kyvetu pro 10 skel.

K detekci AP stačí inkubovat 15 minut při pokojové teplotě, poté se preparát opláchne destilovanou vodou.

4.1.5 Histologické preparáty

Pro přesnou orientaci v mozkové tkáni jsme ke každému řezu určenému na histochemické vyšetření provedli vždy sousední řez pro základní histologické barvení hematoxylinem a eosinem.

Použitá receptura pro barvení v kombinaci hematoxylin + eosin (Vacek, 1972):

- fixace 7 minut v Bakerově roztoku
- trojí opláchnutí vodovodní vodou
- 10 min barvení Mayerovým hematoxylinem (destilovaná voda, hematoxylin, NaIO, kamenec draselný, kyselina citronová, chloralhydrát)
- 10 min nechat v protékající vodovodní vodě k správnému zbarvení hematoxylinu (tvorba tzv. barevného laku)
- 4 min barvení erythrosinem
- opláchnout destilovanou vodou

Po obarvení se preparát odvodní a montuje do Solakrylu.

4.1.6 Hodnocení

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. Skenování obrazů do počítače bylo prováděno do 2 dnů od zhotovení histochemických preparátů. Při skenování každého preparátu se vyvážila bílá barva na pozadí. Pro archivaci obrazů jsme použili plnohodnotný formát bmp (bitmap), velikost ukládaných obrázků byla 4080 x 3072 pixelů. Při použitém zvětšení mikroskopu 40:1 reprezentoval 1 pixel oblast vzorku o velikosti 4,5 μm^2.

Pro identifikaci a ohraničení mozkových struktur jsme užili všeobecně užívané atlasy potkaního mozku od G. Paxinose (Paxinos et Watson, 1987) a J.F.R. Königa (König et Klippel, 1963). Vybrané struktury jsme zprvu hodnotili semikvantitativně ve třech stupních, později jsme přistoupili na kvantifikaci aktivity AChE. 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. Kromě průměrné density pixelu, který je nejstručnějším vyjádřením intenzity zbarvení v ohraničené oblasti, je software schopen vytvořit i histogram, což je zobrazení četnosti všech pixelů od hodnoty 0 až po 255.

4.1.7 Preparáty bránice

Pro demonstraci účinku látek na periferní nervový systém jsme z intoxikovaných zvířat odebírali bránice. Po usmrcení zvířete jsme opatrně otevřeli hrudní a břišní stěnu bez poškození bránice. Bránice byla obstřižena při úponu na kostru, napnuta ježčími bodlinami na vypouklou polystyrenovou destičku hrudní plochou nahoru a ponořena do Bakerova roztoku na 1-2 hodiny. Takto vzniklý preparát byl použit celý pro detekci AChE, postup inkubace byl stejný jako pro mozkové řezy.

4.1.8. Statistické hodnocení

Hodnoty denzity pixelu byly vyjadřovány jako aritmetický průměr ± standardní odchylka průměru. Stejný způsob vyjádření byl použit i pro výsledky biochemického vyšetření. Výsledky obou měření byly prezentovány také jako % z kontrolních hodnot. Transformace křivek, rovnice a korelační koeficient byly získány metodou nejmenších čtverců. Při prvotním stanovení korelace mezi oběma metodami jsme použili také grafické vyjádření dle Blanda a Altmana (Bland et Altman, 1986). Statistické rozdíly v aktivitě AChE byly evaluovány t-testem. Ke grafickému vyjádření změn denzity pixelu při hodnocení terapeutického účinku jsme použili histogram v podobě spojnicového grafu.

4.2 Ověření metodiky

Při hledání optimálního postupu jsme se řídili literaturou a technickými možnostmi našeho pracoviště, následně jsme tuto metodu prověřili prvotním ověřovacím pokusem. Při tomto pokusu jsme hledali optimální tloušťku řezu a čas fixace. Zároveň jsme přitom zjišťovali vliv tloušťky řezů, času fixace a koncentrace substrátu na denzitu pixelu v digitálním obraze histochemického preparátu. Dále jsme zkoumali, zda nedochází k náhodným chybám při histochemickém průkazu, které by způsobily velký rozptyl kvantitativních hodnot a znehodnocovaly navrženou metodu.

Po usmrcení jednoho zdravého laboratorního potkana jsme vyjmuli mozek a rychle jej nechali zamrazit. Pro hodnocení jsme použili řezy z přední poloviny mozku (frontální a parietální lalok). Zde jsme vyšetřovali kortex, jakožto strukturu s nižší fyziologickou aktivitou AChE, a striatum, jako strukturu s vysokou aktivitou AChE. 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 navážkou 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.

Dále jsme provedli sérii 10 řezů následujících za sebou v oblasti frontálního laloku mozku a metodou popsanou v základní metodice jsme je fixovali a kultivovali na detekci aktivity AChE. Podobně jsme postupovali pro oblast striata. Pro tyto řezy jsme použili již definitivní tloušťku 20μm, pětiminutovou dobu fixace a koncentraci substrátu tak, jak byla uvedena v Lojdově návodu (Lojda, 1970). Poté jsme ve všech deseti řezech kvantitativně hodnotili identickou oblast kortexu, resp. striata.

4.3 Korelace s biochemickým stanovením

4.3.1 Intoxikace, zpracování biologického materiálu a histochemické vyšetření

Laboratorní zvířata byla otrávena dávkou LD_{50} sarinu, somanu a VX-látky i.m. Kontrolní 4. 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 přesně popsána výše v části Základní metodika, tj. extrakce mozku, krájení řezů na kryostatu, kultivace na detekci AP a AChE, sledování histochemických preparátů v mikroskopu a zachycení obrazu na digitální médium.

4.3.2 Biochemické vyšetření

Biochemické vyšetření prováděla laboratoř na Katedře toxikologie FVZ UO pod vedením doc. Bajgara. V této práci je biochemické vyšetření prezentováno jako zavedená metoda, s jejímiž výsledky porovnáváme výsledky získané kvantitativním histochemickým vyšetřením. Postup biochemické metody:

Po dekapitaci jsou vyjmuty části mozku a zmraženy na –40 °C. Po rozmražení je tkáň homogenizována v poměru 1:10 s destilovanou vodou v homogenizéru Ultra-Turrax a homogenizáty jsou použity pro enzymatickou analýzu. Aktivita AChE je určena metodou dle Ellmana v úpravě podle Bajgara (Ellman et al., 1961; Bajgar, 1972a). Jako substrát se při této metodě používá acetylthiocholin jodid, jako chromogen 5,5´ bis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), jako pufr TRIS-HCl. Principem metody je stanovení SH-skupiny thiocholinu,

uvolněného enzymatickou hydrolýzou substrátu. Thiocholin reaguje s DTNB za vzniku barevného produktu 5-merkapto-2-nitrobenzoátu, který stanoven spektrofotometricky. K určení absorbance při vlnové délce 412 nm byl použit spektrofotometr Uvikon 752. Změna absorbance je odečítána za 1 minutu při teplotě 25 °C a pH 7,6 při odečtení slepého vzorku (spontánní hydrolýza substrátu). Hodnoty aktivity jsou vyjádřeny jako μmol hydrolyzovaného substrátu/60min/kg vlhké tkáně, případně jako % kontrolních hodnot.

4.3.3 Definice vyšetřovaných oblastí mozku

Ke stanovení aktivity a k porovnání výsledků jsme kvantitativní histochemií měřili aktivitu AChE v částech mozku odpovídajících těm, které jsou rutinně odebírány na Katedře toxikologie FVZ UO. K biochemickému vyšetření na katedře toxikologie byly odebrány tyto části mozku: nucleus amygdalae, frontální kortex, dorzální septum, hypothalamus, hippocampus, mediální thalamus, pontomedulární část kmene mozkového, striatum.

Ke kvantifikaci histochemického vyšetření byly předem vybrány k evaluaci tyto oblasti či jádra 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 (dále uváděno jako 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 (dále uváděn jako 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 od 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 LD_{50} 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 LD_{50} 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 LD_{50} 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 LD_{50} 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 LD_{50} 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 Základní metodika. V tomto experimentu jsme porovnávali výsledky histochemického vyšetření s biochemickými výsledky. Pro tyto účely jsme ohraničili mozková jádra tak, jak bylo uvedeno v části 2.3.3 Definice vyšetřovaných oblastí mozku.

Místo amygdaly a striata zde bylo hodnoceno navíc jádro nucleus ruber, v úrovni 5,8 mm dorzálně od bregmatu.

4.7 Účinek antidot

Laboratorní potkani byli rozděleni do následujících skupin:

1) Tabun: potkani byli intoxikováni 1,2 x LD_{50} 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 minut, 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 (OVLT), 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

Bránice jsme odebrali z každého zvířete, které bylo vyšetřované na aktivitu AChE v mozku. Preparáty bránice byly určeny pouze pro kvalitativní hodnocení, jejich posouzení bylo možno provést pouhým okem nebo stereomikroskopem Olympus SZX7. Fotodokumentace byla provedena za rozptýleného denního světla fotoaparátem Olympus Camedia C-3030.

5. Výsledky

5.1 Ověření metodiky

Výsledky měření jsme zaznamenali do tabulek (tab.1-3). Všechny výsledky jsme uvedli v hodnotě denzity pixelu (pixel value), která je stupněm ve škále 0-255, kde 0 znamená největší tmavost bodu v 8-bitovém černobílém obraze a 255 největší světlost bodu. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze tří vyšetření.

Posuzovaná oblast mozku	tloušťka řezu 10 μm	tloušťka řezu 14 μm	tloušťka řezu 16 μm	tloušťka řezu 20 μm
Striatum	132,3	113,4	98,9	71,4
Frontální kortex	197,8	188,5	178,0	146,4

Tab. 1. Vliv tloušťky řezu na denzitu pixelu.

Posuzovaná oblast mozku	fixace 5 min	fixace 10 min	fixace 20 min	fixace 30 min
Striatum	64,9	75,1	79,6	86,0
Frontální kortex	152,0	154,2	148,9	156,5

Tab. 2. Vliv doby fixace na denzitu pixelu.

Posuzovaná oblast mozku	100 % substrátu	80 % substrátu	65 % substrátu	50 % substrátu
Striatum	68,5	71,3	76,5	88,5
Frontální kortex	149,1	160,0	162,4	168,9

Tab. 3. Vliv koncentrace substrátu na denzitu pixelu.

Z měření vyplývá, že tloušťka histochemického preparátu zřetelně ovlivňuje snímanou denzitu pixelu. Koncentrace substrátu je rovněž faktor, který ovlivňuje tmavost preparátu a tím i denzitu pixelu v digitálním obrazu. Doba fixace je ze třech zkoumaných faktorů tím nejméně významným. V případě striata jsme zaznamenali mírný pokles intenzity zbarvení, ale u mozkové kůry nemůžeme výsledek označit za prokazatelné zvýšení optické denzity.

Průměrná hodnota denzity pixelu měřená na sérii sousedních 10 řezů byla pro striatum 71,1 a pro kortex 147,6. Rozmezí bylo u striata 59 - 89, u kortexu 137 - 174. Standardní odchylka 7,6 u striata, respektive 11,2 u kortexu.

5.2 Korelace s biochemickým pokusem

Výsledky získané měřením a porovnáním jsou zaznamenané v tabulkách (tab. 4-7).

Kontrolní skupina

Posuzovaná oblast mozku	histochemie	biochemie
Amygdala	100,5 ± 9,5	251,3 ± 15,3
Frontální kortex	100,1 ± 5,0	253,0 ± 13,3
Septum	101,3 ± 5,1	251,2 ± 12,3
Hypothalamus	105,2 ± 7,5	262,0 ± 14,3
Hippocampus	121,5 ± 6,3	301,6 ± 15,3
Thalamus	129,6 ± 8,3	325,3 ± 14,8
Retikulární formace	159,6 ± 3,2	385,0 ± 13,3
Striatum	179,9 ± 6,7	1201,0 ± 22,3

Tab. 4. Kontrolní hodnoty použité pro porovnání inhibice AChE nervově paralytickými látkami. Hodnota uvedená ve sloupci „histochemie" je vypočítána jako rozdíl naměřené průměrné hodnota pixelu od 256. Hodnota uvedená ve sloupci „biochemie" byla získána spektrofotometrickým měřením a je v μmol/60 min/kg. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota ± standardní odchylka.

Soman

Posuzovaná oblast mozku	histochemie	% z kontroly	biochemie	% z kontroly
Amygdala	32,1 ± 7,1	31,9	62,8 ± 8,8	25,0
Frontální kortex	19,0 ± 2,3	19,0	38,0 ± 5,9	15,0
Septum	24,1 ± 6,1	23,8	57,7 ± 8,3	23,0
Hypothalamus	24,2 ± 6,5	23,0	65,5 ± 7,8	25,0
Hippocampus	25,0 ± 5,2	20,6	66,3 ± 7,6	22,0
Thalamus	26,1 ± 7,2	20,1	55,3 ± 8,8	17,0
Retikulární formace	27,1 ± 4,2	17,0	53,3 ± 6,8	13,8
Striatum	27,1 ± 8,7	15,1	270,3 ± 13,3	22,5

Tab. 5. Kvantifikace obrazu otravy somanem. Hodnoty uvedené ve sloupcích „histochemie" a „biochemie" byly získány shodným způsobem jako v předcházející tabulce. Hodnoty ve sloupcích „% z kontroly" jsou vždy poměry hodnot ve sloupci nalevo ku hodnotám uvedeným v tabulce 4.

Sarin

Posuzovaná oblast mozku	histochemie	% z kontroly	biochemie	% z kontroly
Amygdala	36,5 ± 11,0	36,3	75,9 ± 7,8	30,2
Frontální kortex	28,4 ± 4,1	28,4	50,6 ± 7,7	20,2
Septum	36,4 v 4,9	35,9	67,3 ± 7,8	26,8
Hypothalamus	37,0 ± 3,7	35,2	98,5 ± 10,3	37,6
Hippocampus	42,9 ± 6,4	35,3	106,2 ± 10,3	35,2
Thalamus	44,9 ± 5,2	34,6	97,0 ± 10,3	29,8
Retikulární formace	34,2 ± 3,8	21,4	58,3 ± 7,3	15,1
Striatum	65,7 ± 10,7	36,5	647,3 ± 16,8	53,9

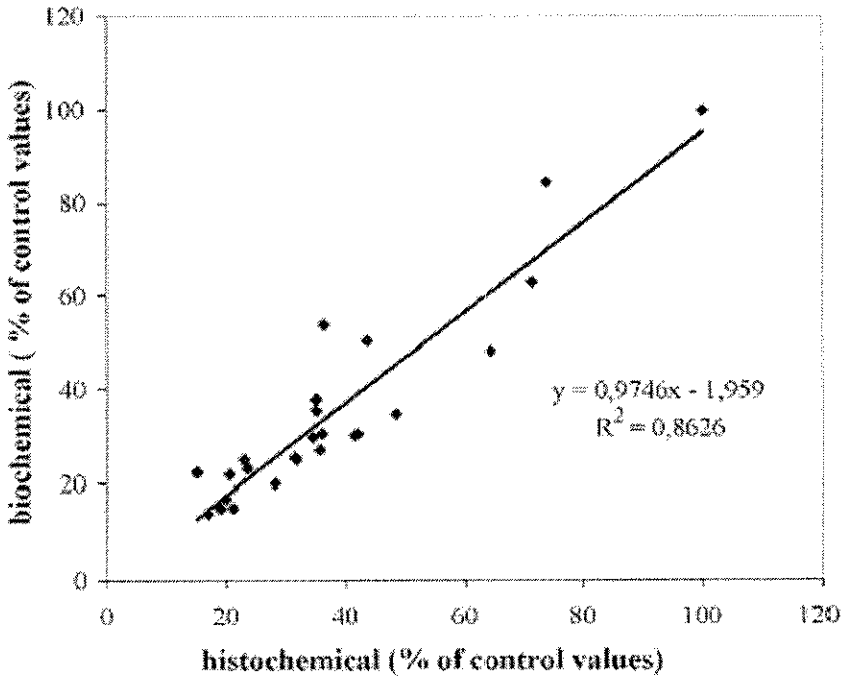
Tab. 6. Kvantifikace obrazu otravy sarinem. Hodnoty jsou uváděné stejným způsobem jako v tab. 5.

VX látka

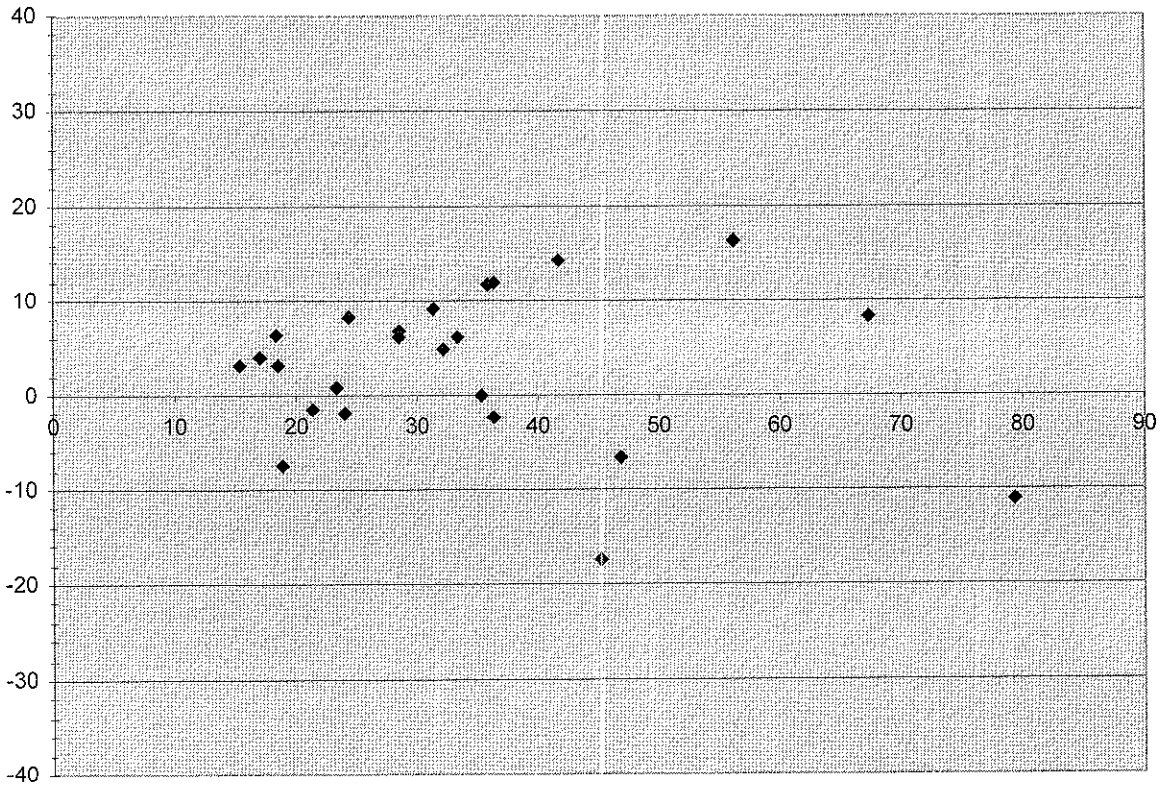
Posuzovaná oblast mozku	histochemie	% z kontroly	biochemie	% z kontroly
Amygdala	71,9 ± 6,4	71,5	158,8 ± 9,8	63,2
Frontální kortex	41,6 ± 3,5	41,6	75,9 ± 8,9	30,0
Septum	49,4 ± 7,1	48,7	86,7 ± 9,3	34,5
Hypothalamus	44,5 ± 5,5	42,3	79,4 ± 8,9	30,3
Hippocampus	53,0 ± 6,0	43,6	151,3 ± 9,8	50,2
Thalamus	83,4 ± 5,2	64,4	156,0 ± 10,8	48,0
Retikulární formace	50,5 ± 3,9	31,6	98,3 ± 7,8	25,5
Striatum	132,5 ± 12,4	73,7	1018,1 ± 17,8	84,8

Tab. 7. Kvantifikace obrazu otravy VX látkou. Hodnoty jsou uváděné stejným způsobem jako v tab. 5.

Hodnoty ve sloupcích „% z kontroly" získaných histochemickou a biochemickou metodou byly porovnány a podrobeny korelaci. Výpočet rovnice je uveden v grafu 1. Korelaci hodnotíme jako dobrou. Z Blandova a Altmanova zobrazení vyplývá, že pouze 2 body jsou mimo limit 2 standardních odchylek (graf 2). Obě metody jsou v dobré shodě.



Graf 1. Porovnání výsledků získaných histochemickým a biochemickým vyšetřením. Převzato z publikace (Bajgar et al., 2007c) se souhlasem autora.



Graf 2. Zobrazení shody metod dle Blanda a Altmana (Bland et Altman, 1986). Osa x: průměr z % kontroly získaný histochemickým a biochemickým vyšetřením. Osa y: rozdíl % kontroly získaný histochemickým a biochemickým vyšetřením. Pouze 2 body jsou mimo limit 2 standardních odchylek (2s = 15,83). Obě metody jsou v dobré shodě.

5.3 Inhibice acetylcholinesterázy G-látkami

5.3.1 Sledování klinických známek otravy

U intoxikovaných zvířat jsme pozorovali známky intoxikace OF, zejména slinění, zvýšenou defekaci, poruchy ventilace a křeče. Ve skupině s aplikací somanu zahynul v době do 30 minut jeden laboratorní potkan. Ve skupině s aplikací tabunu zahynuli dva potkani. Ve skupině potkanů intoxikovaných sarinem nedošlo v době do třiceti minut k úhynu.
V kontrolní skupině nebyly sledovány žádné změny a všechna zvířata přežila 30 minut.

5.3.2 Popis histochemického obrazu v kontrolní skupině

Při slovním popisu struktur mozku můžeme využít semikvantitativní několikastupňové vyjádření, které používá klasická histochemie. U vybraných jader uvádíme v závorce průměrnou naměřenou denzitu pixelu v nepozměněné stupnici, tj. 0 – 255, kde s přibývající tmavostí obrazu hodnota čísla klesá.

Nález v kontrolní skupině vypovídá o přirozeném rozložení aktivity AChE u zdravých pokusných zvířat. V telencefalu jeví velmi silnou aktivitu striatum (caudatum a putamen) (12,1) a ventrální striatum (nc. accumbens a jádra tuberculi olfactorii). Tyto struktury mají vůbec nejsilnější aktivitu AChE v mozku. V komplexu amygdalárních jader dominovala bazolaterální jádra (20,5), ostatní jádra byla měla slabou aktivitu, centrolaterální jádra se mírně odlišovala velmi slabou aktivitou. V oblasti kortexu byla naznačená stratifikace, mezi jednotlivými oblastmi neokortexu jsme neshledali výrazný rozdíl. Aktivitu jsme hodnotili jako střední (80,1). Ze septálních jader byla nejvýraznější zona lambdoidea (22,1) a nc. triangularis. V oblasti laterálních jader byl zřetelný proužek silnější aktivity. Hippocampus jevil výraznou stratifikaci – velmi výrazná byla lamina pyramidalis (16,2), přičemž mezi oblastmi CA1 – CA3 byl jen malý rozdíl. Podobnou stratifikaci jsme sledovali i v gyrus dentatus.

V diencefalu jsme sledovali pestrý obraz aktivity AChE v thalamických jádrech oproti relativně uniformní aktivitě v hypothalamu. Nejsilnější aktivitu měly nuclei reticularis (12,6), laterodorsales (15,6) a anteroventrales thalami (13,1), protikladem byla jádra nuclei ventrales posteromediales (53,2) a ventrales posterolaterales (71,5). Silnou aktivitu jsme nalezli též v zona incerta (24,1). Je nutné poznamenat, že v anteroventrálních a retikulárních jádrech thalamu je také silná aktivita BuChE. Vzhledem k tomu, že v protokolech nepoužíváme supraselektivní inhibitory BuChE, je nutné v případě těchto jader interpretovat nález jako celkovou aktivitu cholinesteráz.

Mesencephalon jevil ve svých jádrech různou aktivitu AChE. Nejsilnější aktivita byla

zaznamenána v oblastech strata grissea colliculi superiores (13,9) a v pars compacta substantiae nigrae. Silnou aktivitu měly rovněž area praetectalis a nc. interpeduncularis. Střední aktivitu jsme detekovali v corpus geniculatum laterale a substantia grissea centralis, v níž prominovala jádra nucleus Darkševiči a nucleus oculomotorius. Slabší aktivitu jsme nalezli v corpus geniculatum mediale, v colliculi inferiores a v nucleus ruber.

Mezi kmenové struktury s největší aktivitou AChE patřilo jádro XII. hlavového nervu (16,1) a další motorická jádra hlavových nervů (V, VII, X) . Silně vynikala jádra nuclei pontis, dorzální a laterodorzální jádra tegmenta a nc. accumbens. Silnou aktivitu jsme také zjistili v nc. mesencephalicus trigemini, nuclei vestibulares et cochleares, nc. gracilis. Většina tegmenta s retikulární formací měla aktivitu střední (40 – 50). Slabou aktivitu jsme nalezli v senzitivních jádrech trigeminu a jádrech komplexu nuclei olivares inferiores i nuclei olivares superiores.

Aktivita AChE v mozečkové kůře byla výrazně stratifikována. Stratum granulare mělo silnou aktivitu (36,2), stratum moleculare naopak slabou (167,8). Jádra mozečku měla aktivitu střední. Aktivita AChE byla nalezena také v některých svazcích nervových vláken. Nejsilnější jsme detekovali v fasciculus retroflexus, ve stria medullaris thalami a v intraparenchymovém průběhu n. facialis.

5.3.3 Popis histochemického obrazu otravy G-látkami

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.

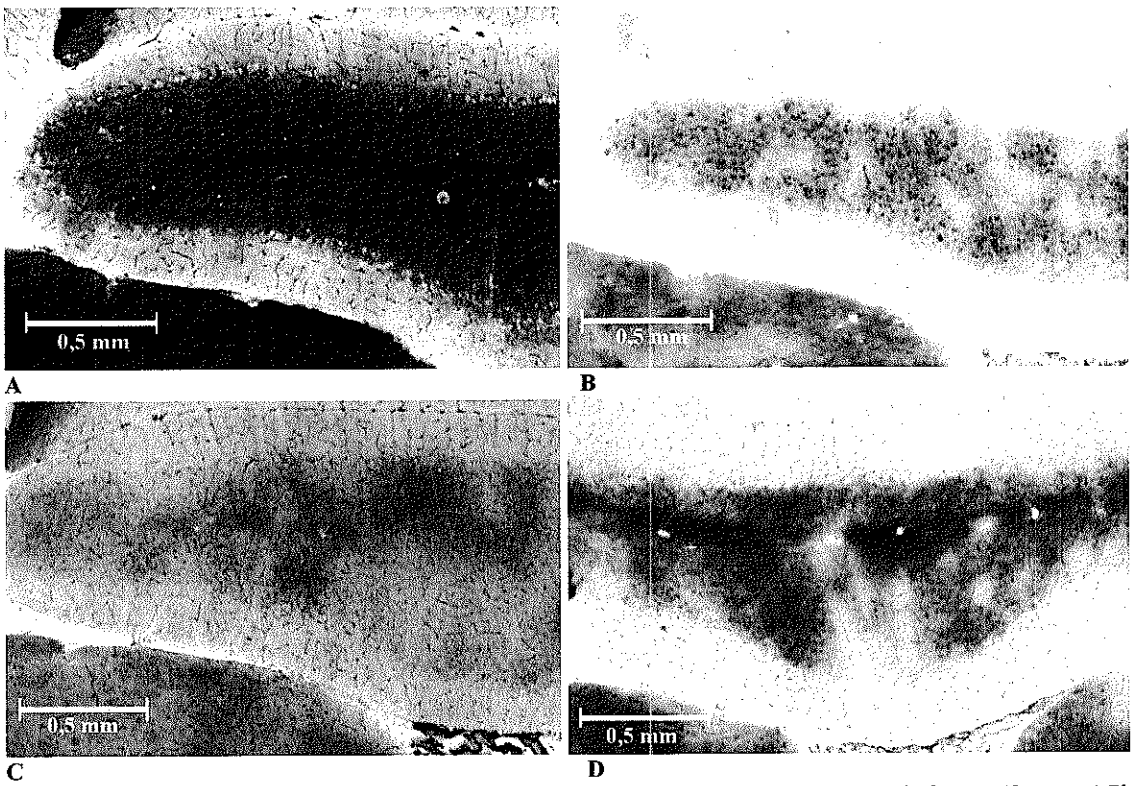
Při intoxikaci somanem byly nalezeny ložiskové zbytky silné aktivity AChE ve striatu a v nucleus accumbens (46,7) a dále v bazolaterálním jádru amygdaly. Aktivita AChE v mozkové kůře jevila silnou inhibici (204,5). Septální jádra byla rovněž silně inhibována, pouze v zona lambdoidea zůstala střední aktivita AChE. V hippocampu se stratifikace částečně setřela, lamina pyramidalis měla ložiska střední aktivity. V thalamu zůstala slabší aktivita v nuclei laterodorsales (126,9), nc. reticularis (127,1) a nc. centralis medialis (129,8). Ostatní jádra thalamu měla ještě nižší aktivitu než předchozí, nejmarkantněji nc. ventralis posterolateralis (198,6). Hypothalamus byl silně inhibován, zona incerta měla slabou aktivitu

(132,5). V mezencefalických strukturách si zachovaly střední aktivitu stratum grisseum superficiale v colliculi superiores (96,0) a substantia nigra. V inhibované periakveduktální šedi prominovalo jádro III. hlavového nervu. V mozkovém kmeni byla střední až silná aktivita v motorických jádrech hlavových nervů V, VII, X a XII a dále v nuclei dorsales tegmenti. Kůra mozečku měla zachovalou stratifikaci, ale aktivita AChE byla silně snížena. Nejaktivnější bylo stratum granulosum (150,1). Lze tedy říci, že stejná jádra, která měla silnou aktivitu AChE v kontrolní skupině, si zachovala střední až slabou aktivitu po otravě somanem, čímž dominovala v obrazu inhibované mozkové tkáně.

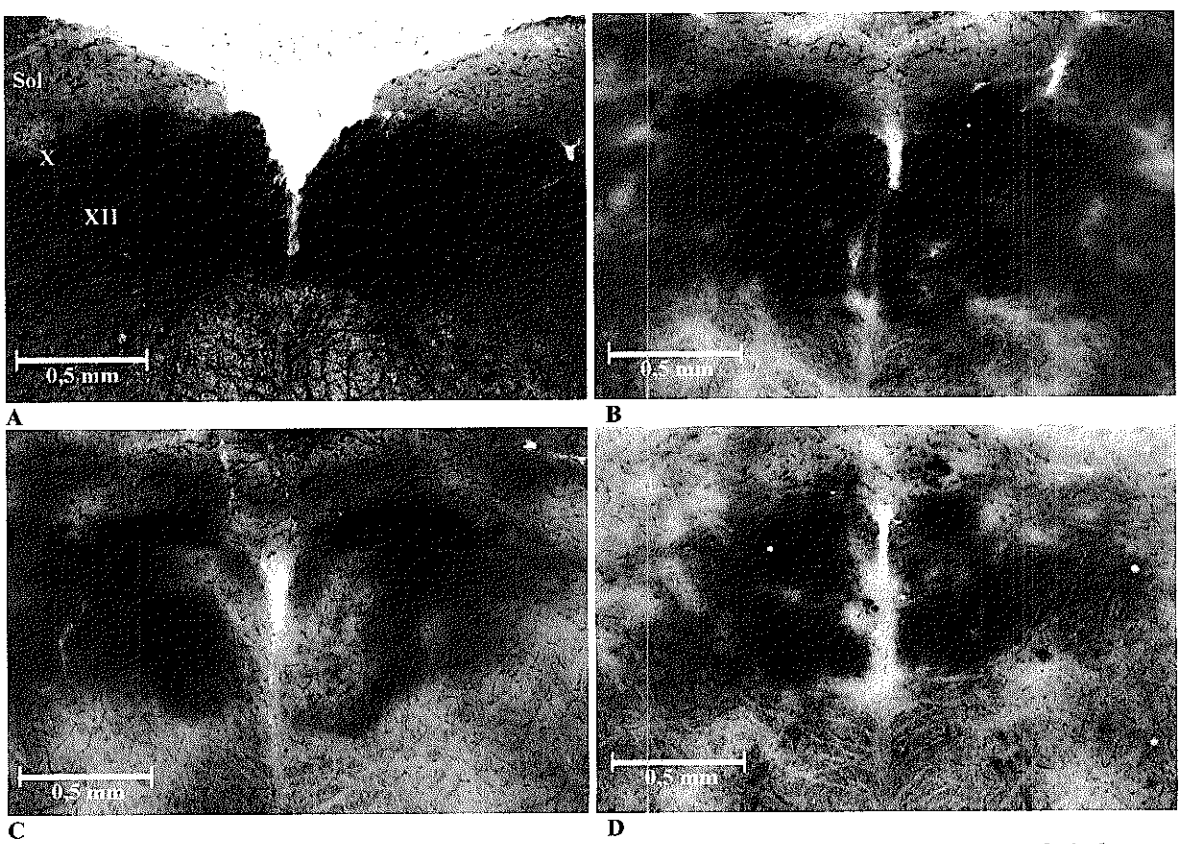
Intoxikace tabunem vedla k téměř stejnému morfologickému obrazu jako otrava somanem, s malými rozdíly v aktivitě AChE. Striatum jevilo nehomogenní inhibici s ložisky silné aktivity. V thalamu byla zachována silnější aktivita v nuclei anterodorsales a anteroventrales (78,1), ostatní jádra byla inhibována, včetně nuclei reticulares a laterodorsales. V inhibovaném hypothalamu jsme detekovali zřetelnější nc. arcuatus, ložiska silnější aktivity byla přítomna v area hypothalamica lateralis. V nc. interpeduncularis v mezencefalu vynikly subnuclei rostrolaterales a dorsomediales (30,9), které byly kontrastně silné proti ostatním slabým podjádrům. Slabá aktivita AChE byla v povrchové vrstvě šedi v colliculi superiores (135,0). V mozkovém kmeni měla silnou aktivitu motorická jádra hlavových nervů X a XII (43,2), zatímco jádra VII. a V. nervu jen střední až slabou. Silnou aktivitu si zachovaly též nc. ambiguus a dorsální a laterodorsální jádra tegmenta (30,5) včetně sousedních parabrachiálních jader. Kůra mozečku měla jen slabou aktivitu. Zajímavým nálezem bylo, že útvary bílé hmoty zmiňované v popisu kontrolní skupiny, vykazovaly při otravě tabunem relativně silnou aktivitu AChE.

Otrava sarinem vedla k podobnému obrazu jako u předchozích dvou látek. Celková inhibice však byla nižší a také ložiskové výpadky byly méně vyjádřeny. Silnou aktivitu jsme objevili ve striatu (39,0), ventrálním striatu a bazolaterálních jádrech amygdaly, z diencefalických struktur v anterodorsálních a anterolaterálních jádrech thalamu (56,2). V tkáni mezencefala s inhibovanou AChE vynikaly silnou aktivitou nc. interpeduncularis (41,2) a jádro III. hlavového nervu. Jednotlivé vrstvy šedé hmoty v colliculi superiores se lišily – stratum intermediale mělo silnou aktivitu (62,3), zatímco stratum superficiale slabou (120,4). V pontomedulární oblasti byly nejaktivnější laterodorsální jádra tegmenta (33,1). Stratum granulosum mozečkové kůry jevilo slabou až střední aktivitu.

Všechny měřené hodnoty v experimentálních skupinách (soman, sarin, tabun) byly signifikantně odlišné od kontrolní skupiny ($p<0.05$). Jako příklad oblasti, kde došlo k silné



Obr. 5. Kůra mozečku jako příklad struktury, kde došlo k silné inhibici G-látkami. Aktivita AChE a AP, úroveň řezu 12,5 mm dorzálně od bregmatu. A - kontrola, B - soman, C – tabun. D – sarin.



Obr. 6. Motorická jádra hlavových nervů jako příklad struktury, kde byla zachována silná aktivita AChE při otravě G-látkami. Aktivita AChE a AP, úroveň řezu 13,8 mm dorzálně od bregmatu. A - kontrola, B - soman, C – tabun. D – sarin. Sol = nucleus tractus solitarii; X = nucleus dorsalis nervi vagi; XII = nucleus nervi hypoglossi.

inhibici G-látkami, uvádíme obrázek kůry mozečku (obr. 5), příkladem zachované silné aktivity jsou motorická jádra hlavových nervů (obr. 6).

5.4 Inhibice acetylcholinesterázy V-látkami

5.4.1 Sledování klinických známek otravy

Všechna zvířata po intoxikaci VX a RVX jevila známky intoxikace NPL. Méně byly vyjádřeny vegetativní příznaky, více porucha ventilace a křeče. Ve skupině s aplikací VX přežili všichni jedinci. Ve skupině potkanů intoxikovaných RVX došlo v době do třiceti minut ke dvěma úhynům ze tří (18 a 25 minut). V kontrolní skupině nebyly sledovány žádné změny a všechna zvířata přežila 30 minut.

5.4.2 Popis histochemického obrazu otravy V-látkami

V případě otravy V-látkami nebyly pozorovány ložiskovité výpadky aktivity AChE v jádrech, na rozdíl od G-látek.

Při otravě RVX v předním mozku dominovaly striatum a nc. accumbens silnou až velmi silnou aktivitou AChE. V amygdale měla silnou aktivitu bazolaterální jádra. Kortex jevil slabou aktivitu. Aktivita v septu byla silná v lambdoidní zóně a v nc. triangularis, v laterálních jádrech byla slabá. Nález v hippocampu se v rámci pokusné skupiny lišil – u dvou ze tří potkanů se objevily výpadky v lamina pyramidalis, které přerušovaly stratifikaci kůry, zatímco u jednoho jedince jsme nalezli obraz téměř srovnatelný s normou. V oblasti thalamu byla velmi silná aktivita v anterolaterálních jádrech, silná v retikulárních a laterodorzálních jádrech a též v ncl. reuniens. Nc. subthalamicus měl silnou aktivitu AChE, zona incerta spíše střední. Inhibicí AChE v okolní tkáni vystoupila aktivita těchto jader a oblastí: nc. paraventricularis hypothalami, pars compacta substantiae nigrae, nc. interpeduncularis, area praetectalis a area ventralis tegmenti. Silnou aktivitu ve kmeni jsme detekovali v motorických jádrech hlavových nervů, nuclei pontis, nuclei dorsales et laterodorsales tegmenti. Retikulární formace jevila střední aktivitu, olivární jádra slabou. Kůra mozečku měla zachovanou stratifikaci, ale stratum granulare dosáhlo jen střední aktivity AChE.

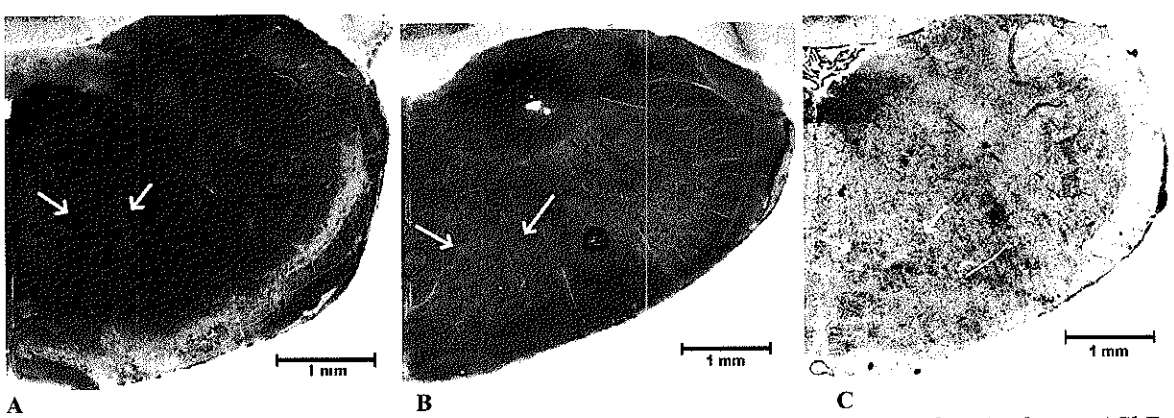
Otrava VX látkou měla velmi podobný histochemický obraz, v přední části mozku se výsledek lišil jen vyšší celkovou inhibicí. Aktivita AChE v lamina pyramidalis v hipokampu vytvářela nepřerušený proužek, dosahovala však jen středních hodnot. V thalamu byla silná aktivita v anterolaterálních, retikulárních a laterodorzálních jádrech. V colliculi superiores mělo silnou aktivitu stratum intermediale i stratum superficiale. V mozkovém kmeni

vykazovaly nejvyšší aktivitu skupiny buněk nc. dorsalis nervi vagi a nucleus ambiguus. Retikulární formace jevila slabou až střední aktivitu.

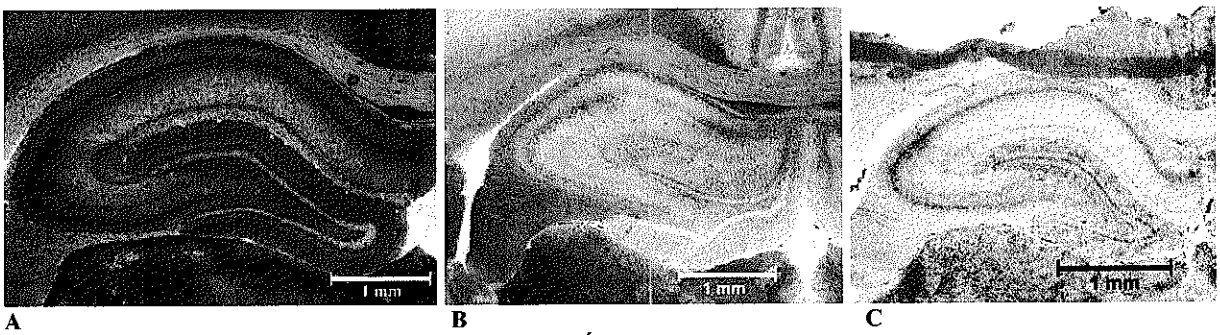
Vybrané kvantitativní výsledky z histochemických preparátů zvířat po intoxikaci V-látkami jsme zařadili do tabulky 8. Všechny měřené hodnoty v obou experimentálních skupinách (s vyjímkou RVX v oblasti frontálního kortexu) byly signifikantně rozdílné od kontrolní skupiny ($p<0.05$). Obrázky 7 a 8 prezentují histochemické preparáty oblasti nc. gigantocellularis a hipokampu. Graf 3 byl získán porovnáním našich výsledků s výsledky biochemického vyšetření. Výsledek experimentu lze uzavřít tvrzením, že ve většině struktur CNS byla zjištěna vyšší inhibice při použití LD_{50} G-látek než V-látek.

Posuzovaná oblast mozku	kontrola	VX	% z kontroly	RVX	% z kontroly
Nucleus ruber	198,0 ± 8,2	126,2 ± 10,1	63,7	193,6 ± 9,8	97,8
Frontální kortex	185,9 ± 6,0	63,2 ± 6,1	34,0	94,5 ± 7,1	50,8
Septum	198,4 ± 6,4	71,6 ± 8,5	36,1	79,6 ± 6,1	40,1
Hypothalamus	205,6 ± 4,3	82,4 ± 5,9	40,1	112,3 ± 3,9	54,6
Hippocampus	224,5 ± 7,0	83,6 ± 5,7	37,2	106,2 ± 7,7	47,3
Thalamus	220,7 ± 5,8	112,8 ± 9,7	51,1	110,1 ± 9,2	49,9
Retikulární formace	231,8 ± 7,0	104,3 ± 8,8	45,0	175,4 ± 6,9	75,7

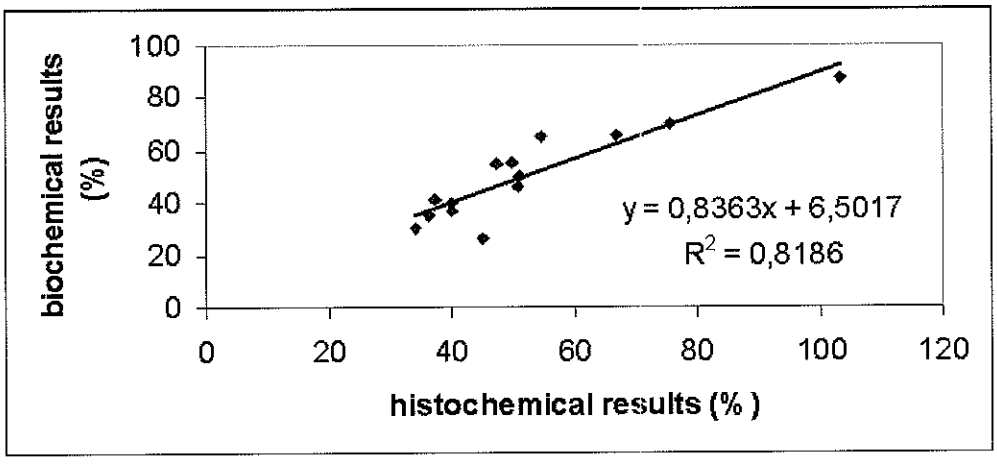
Tab. 8. Kvantifikace rozdílné inhibice AChE při použití VX a RVX. Uvedené hodnoty jsou vypočítány jako rozdíl naměřené průměrné hodnota pixelu od 256. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota ± standardní odchylka. Hodnota ve sloupci „% z kontroly" je poměr hodnot ve sloupci nalevo ku hodnotám uvedeným v tabulce kontrola.



Obr. 7. Nc. gigantocellularis retikulární formace (poloha jádra označena šipkami), aktivita AChE a AP. Úroveň řezu 13,3 mm dorzálně od bregmatu. A - kontrola, B - RVX, C – VX.



Obr. 8. Hippocampus, aktivita AChE a AP. Úroveň řezu 3 mm dorzálně od bregmatu. A - kontrola, B - RVX, C – VX.



Graf 3. Porovnání výsledků získaných histochemickým a biochemickým vyšetřením.

5.5 Protektivní účinek huperzinu A

5.5.1 Sledování klinických známek otravy

Po intoxikaci somanem dvě ze tří zvířat uhynula v době do 30 minut od podání dávky, konkrétně jedno za 25 min, jedno za 30 min. Všichni potkani jevili typické známky otravy OF – slinění, porucha ventilace, křeče. U zvířat, kterým byl podán pouze huperzinem A, byl pozorován pouze drobný třes v době do 30 minut po aplikaci huperzinu A. Všechna zvířata v této skupině přežila 30 minut.

U zvířat předléčených huperzinem A, kterým byl podán po 1 hodině soman, byl pozorován podobný průběh jako u zvířat vystavených pouze huperzinu A. Pouze u jednoho jedince třes přetrvával po celou dobu sledování. Všechna zvířata přežila. Ze zvířat, jimž byla aplikována RVX, jeden jedinec zahynul do 30 minut. Typické známky otravy byly zjevné podobně jako u skupiny se somanem, ale byly méně vyjádřeny. Zvířata s kombinací aplikace huperzinu A a RVX rovněž přežila všechna. Byly pozorovány slabé křeče.

5.5.2 Popis histochemického obrazu při profylaktickém užití huperzinu A

Po podání samotného huperzinu A v uvedené dávce jsme nalezli histochemický obraz velmi podobný kontrolnímu vzorku. Došlo pouze k mírnému snížení aktivity AChE.

Kombinace huperzinu A a RVX vedla ke snížení aktivity AChE v mozku oproti kontrole. Ve striatu a bazolaterálních jádrech amygdaly byla silná aktivita. V septu a v hipokampu jsme nalezli obraz podobný kontrole, ale popsané struktury dosahovaly jen středních aktivit. V kortexu byla slabá až střední aktivita. Z thalamických jader měly velmi silnou aktivitu anterodorzální a anterolaterální jádra, retikulární jádra dosáhly pouze středních hodnot. Oblast hypothalamu měla slabou aktivitu, zona incerta silnou. Ze struktur mezencefala jevilo nejsilnější aktivitu nc. interpeduncularis, silnou substantia nigra a colliculi superiores (zejména stratum grisseum intermediale). Substantia grissea centralis měla střední aktivitu, area praetectalis vystoupila proti okolí silnou aktivitou AChE. V mozkovém kmeni měla silnou aktivitu motorická jádra, dorzální jádra tegmenta a nucleus ambiguus. Retikulární formace měla střední aktivitu. Stratum granulare v mozečku jevilo střední aktivitu.

Profylaktické podání huperzinu A před aplikaci somanu vedlo k obrazu mírné až střední inhibice AChE v mozku. Oblasti striata a bazolaterálního jádra amygdaly měly silnou až velmi silnou aktivitu. Aktivitu v kortexu jsme vyhodnotili jako střední, v septu byl velmi podobný obraz i intenzita zbarvení jako při použití samotného huperzinu A. Hippocampus jevil střední až silnou aktivitu v lamina pyramidalis, zejména v oblasti CA2. V diencefalu byl podobný obraz distribuce AChE jako u samotného huperzinu A, aktivita byla poněkud nižší. V mezencefalu měly silnou aktivitu substantia nigra – pars compacta, colliculi superiores - strata grissea, corpora geniculata lateralia a nc. interpeduncularis. Z motorických jader ve kmeni měla silnou aktivitu jádra XII., X. a V. hlavového nervu, nucleus nervi facialis jevil střední aktivitu. Silná aktivita AChE dále byla v dorzálních jádrech tegmenta, nc. ambiguus, nc. mesencephalicus nervi trigemini. Aktivitu v nuclei pontis a nuclei vestibulares jsme hodnotili jako středně silnou až silnou. Retikulární formace měla střední aktivitu. Nález v mozečku byl téměř srovnatelný s kontrolou.

5.5.3 Kvantifikace nálezu

Podání huperzinu A vedlo k nejsilnější inhibici AChE v oblasti frontálního kortexu (zbylá aktivita přibližně 70%). Nejvíce rezistentní strukturou vůči působení huperzinu se ukázal nc. ruber (tab. 9). Podání somanu vedlo k silné inhibici AChE ve všech vyšetřovaných strukturách s vyjímkou 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 (tab. 10). Profylaktický účinek huperzinu A u RVX byl slabší, v případě některých jader dokonce téměř nulový (nc. gigantocellularis retikulární formace, nc. ruber) (tab. 11).

Účinek huperzinu A vůči somanu demonstrujeme na příkladu nc. gigantocellularis a hipokampu (obr. 9-10), účinek huperzinu A k AChE inhibované RVX na příkladu frontálního kortexu a hypothalamu (obr. 11-12).

Při posouzení profylaktického účinku huperzinu A byly histochemické výsledky korelovány s biochemickými (graf 4), podobně jako v předchozím popsaném experimentu. V tabulkách 9-11 jsou proto uvedeny mozkové oblasti v souladu s tím, jak byly definovány v části 4.3.3., navíc zde bylo hodnoceno jádro nc. ruber 5,6 mm dorzálně od bregmatu.

Posuzovaná oblast mozku	kontrola	huperzin A	% z kontroly
Frontální kortex	181,1 ± 8,9	125,6 ± 5,5 *	69,3
Hippocampus	221,6 ± 7,2	165,9 ± 5,8 *	74,9
Hypothalamus	203,4 ± 9,0	184,2 ± 9,8 *	90,6
Nucleus ruber	187,9 ± 7,4	198,4 ± 11,9	105,6
Retikulární formace	226,9 ± 9,3	176,6 ± 5,6 *	77,8
Septum	192,7 ± 8,4	152,3 ± 7,1 *	79,0
Thalamus	223,9 ± 6,3	214,1 ± 10,6 *	95,6

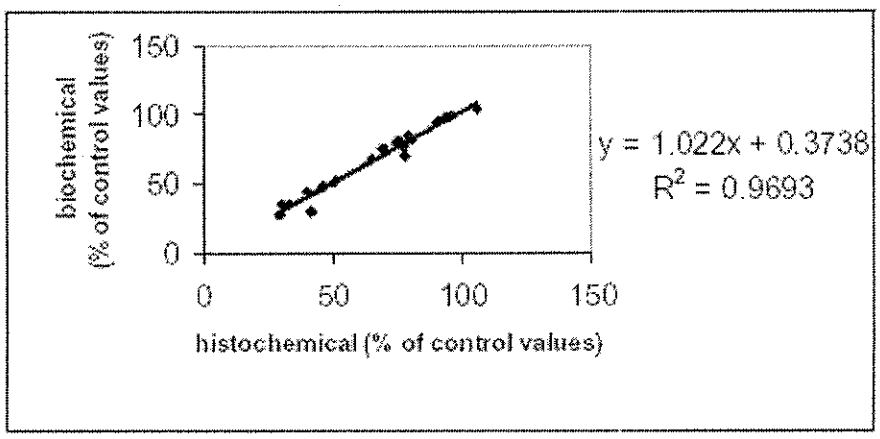
Tab. 9. Kvantifikace účinku huperzinu A. Uvedené hodnoty jsou vypočítány jako rozdíl naměřené průměrné hodnota pixelu od 256. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota ± standardní odchylka. Hodnota ve sloupci „% z kontroly" je poměr hodnot ve sloupci nalevo ku hodnotám uvedeným ve sloupci „kontrola". Hodnoty označené hvězdičkou jsou signifikantně nižší než v kontrolní skupině (p<0,05).

Posuzovaná oblast mozku	soman	% z kontroly	huperzin A + soman	% z kontroly
Frontální kortex	53,4 ± 6,8	29,5	83,8 ± 5,8 *	46,3
Hippocampus	89,6 ± 10,6	40,4	112,6 ± 6,8 *	50,8
Hypothalamus	66,8 ± 6,4	32,8	154,7 ± 7,1 *	76,0
Nucleus ruber	141,1 ± 5,3	75,1	176,4 ± 9,0 *	93,9
Retikulární formace	63,7 ± 4,4	28,1	147,4 ± 6,6 *	65,0
Septum	57,7 ± 5,1	29,9	154,7 ± 5,3 *	80,3
Thalamus	74,1 ± 5,0	33,1	172,6 ± 8,7 *	77,1

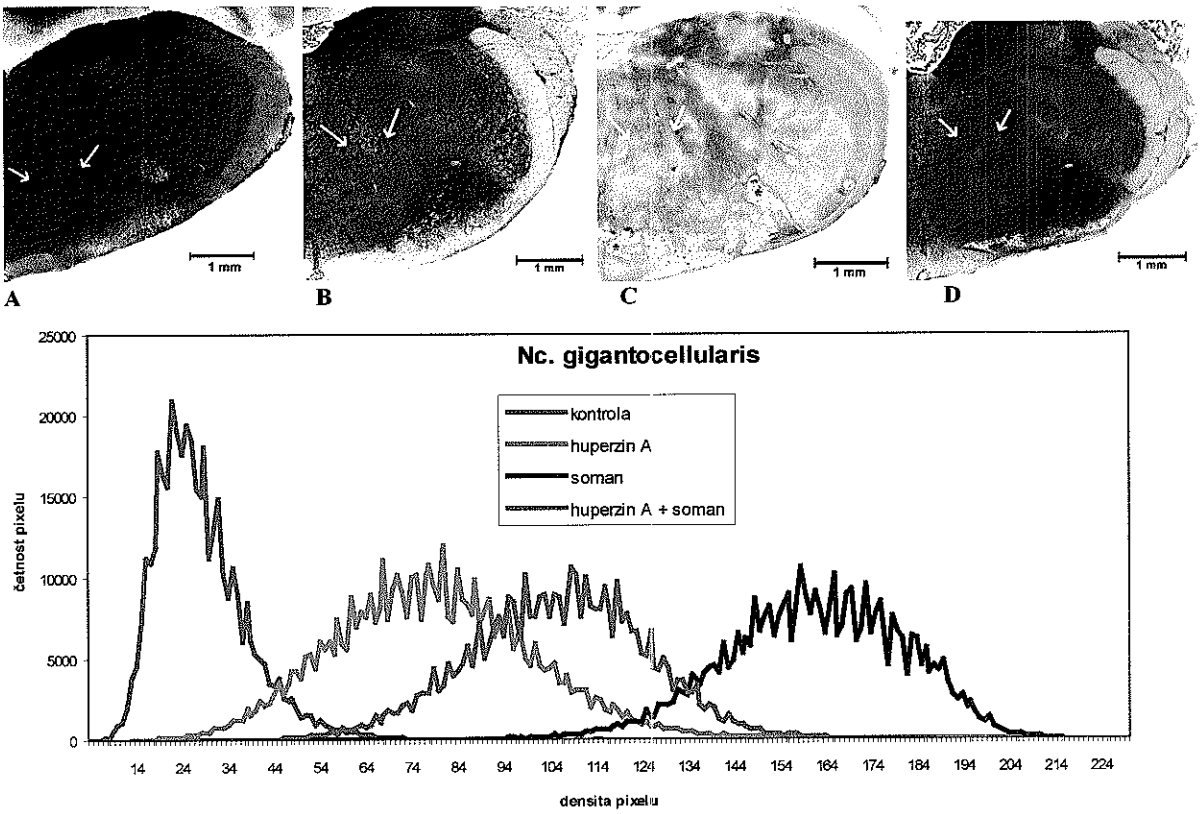
Tab. 10. Kvantifikace profylaktického účinku huperzinu A při otravě somanem. Hodnoty jsou uvedeny stejným způsobem jako v předcházející tabulce. Hodnoty označené hvězdičkou jsou signifikantně vyšší než ve skupině intoxikované pouze somanem ($p<0,05$).

Posuzovaná oblast mozku	RVX	% z kontroly	huperzin A + RVX	% z kontroly
Frontální kortex	95,4 ± 7,8	52,7	98,6 ± 4,8	54,4
Hippocampus	107,2 ± 6,1	48,4	82,7 ± 7,1	37,3
Hypothalamus	113,3 ± 10,0	55,7	125,2 ± 7,8 *	61,6
Nucleus ruber	194,6 ± 7,8	103,6	176,6 ± 5,1	94,0
Retikulární formace	176,4 ± 9,4	77,7	171,5 ± 6,8	75,6
Septum	80,6 ± 5,9	41,8	88,3 ± 6,4 *	45,8
Thalamus	111,1 ± 12,8	49,6	154,1 ± 8,8 *	68,8

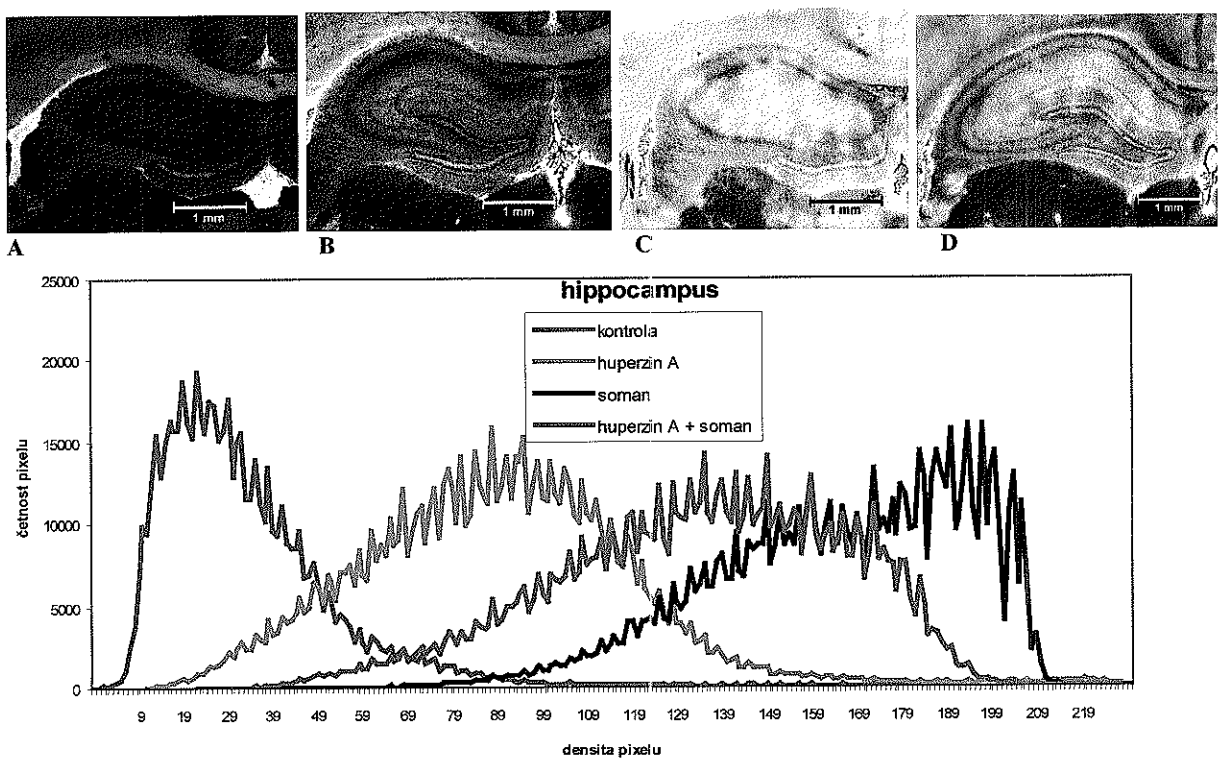
Tab. 11. Kvantifikace profylaktického účinku huperzinu A při otravě RVX. Hodnoty jsou uvedeny stejným způsobem jako v tabulce 9. Hodnoty označené hvězdičkou jsou signifikantně vyšší než ve skupině intoxikované pouze RVX ($p<0,05$).



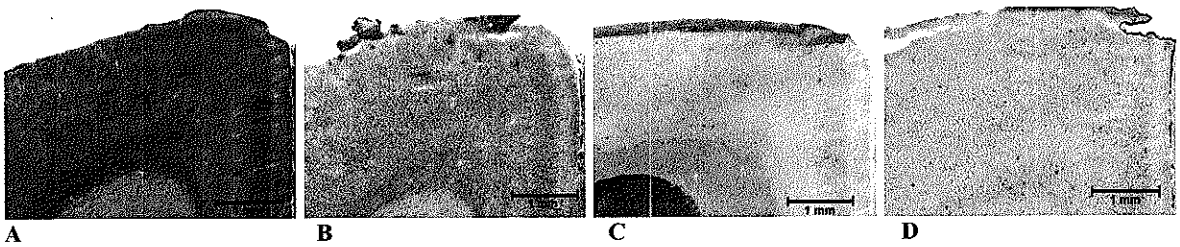
Graf 4. Porovnání výsledků získaných histochemickým a biochemickým vyšetřením. Převzato z publikace (Bajgar et al., 2007b) se souhlasem autora.

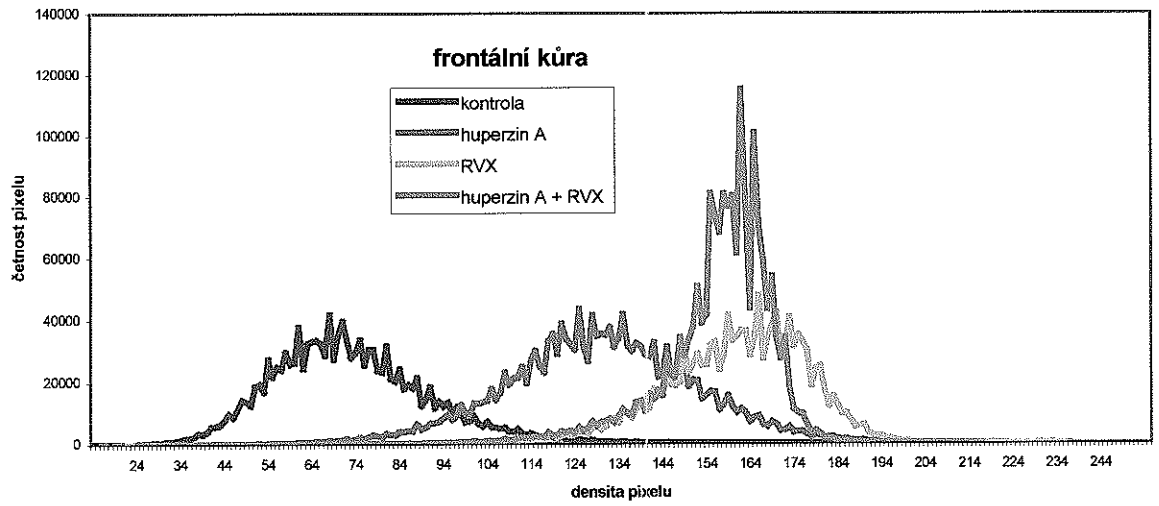


Obr. 9. Nc. gigantocellularis retikulární formace (poloha jádra označena šipkami), aktivita AChE a AP. Úroveň řezu 13,3 mm dorzálně od bregmatu. A - kontrola, B - huperzin A, C – soman, D – huperzin A + soman, E – histogram. Hvězdička označuje artefakt.



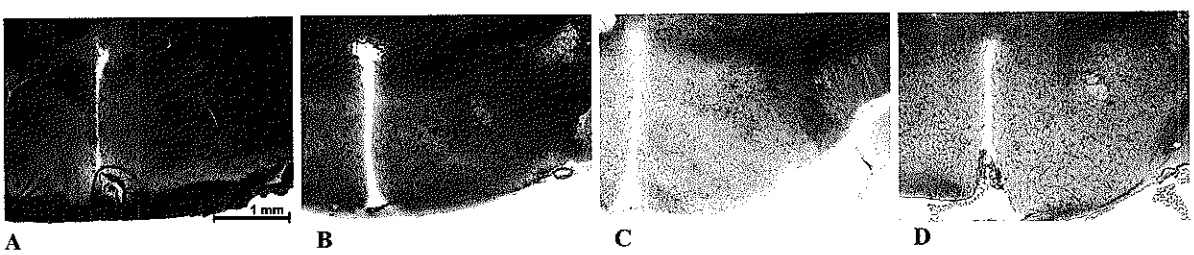
Obr. 10. Hippocampus, aktivita AChE a AP. Úroveň řezu 3 mm dorzálně od bregmatu. A - kontrola, B - huperzin A, C – soman, D – huperzin A + soman, E – histogram.

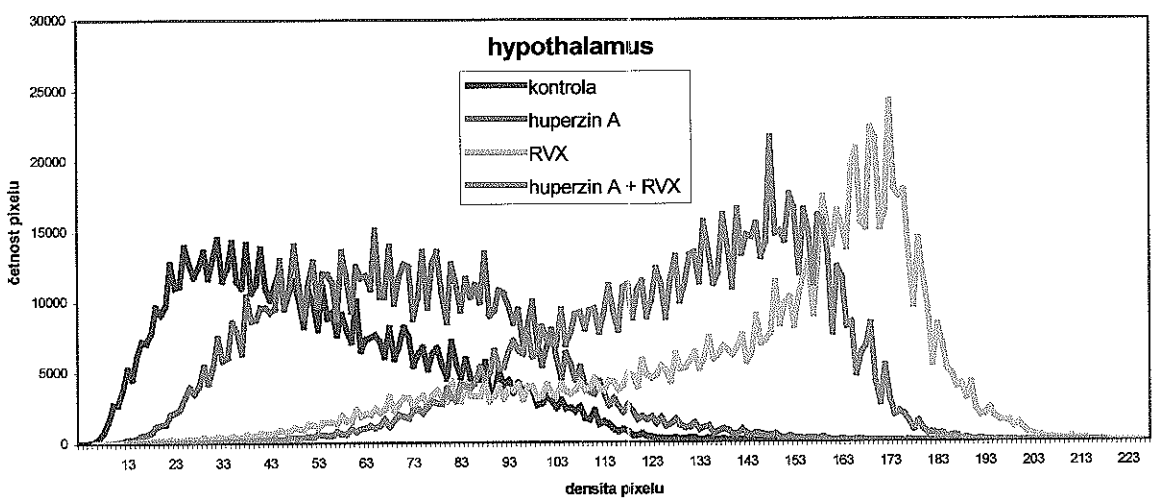




E

Obr. 11. Frontální kortex, aktivita AChE a AP. Úroveň řezu 2,2 mm ventrálně od bregmatu. A - kontrola, B - huperzin A, C – RVX, D – huperzin A + RVX, E – histogram.





E

Obr. 12. Hypothalamus, aktivita AChE a AP. Úroveň řezu 2,2 mm dorzálně od bregmatu. A - kontrola, B - huperzin A, C – RVX, D – huperzin A + RVX, E – histogram. Hvězdička značí artefakt.

5.6 Účinek antidot při otravě tabunem

5.6.1 Sledování klinických známek otravy

Po intoxikaci tabunem jedno ze tří zvířat uhynulo v době do 30 minut po podání dávky. U všech potkanů v této skupině se projevovaly typické známky otravy OF. U žádných zvířat ve skupinách s podanými antidoty ani v kontrolní skupině nebyly sledovány prokazatelné změny vegetativních funkcí, motoriky nebo chování. Všechna zvířata v těchto ostatních skupinách přežila 30 minut.

5.6.2 Popis histochemického obrazu otravy tabunem s antidotní léčbou

Obecně lze říci, že kombinace podání tabunu a antidot vedla v případě HI-6 a obidoximu ke zvýšení aktivity AChE. Intenzita zbarvení při detekci AChE ve skupině s antidotním podáním K048 se příliš nelišila od obrazu otravy tabunem. V případě všech tří kombinací jsme nalezli nehomogení rozložení aktivity s ložiskovými výpadky, podobně jako byly popsány při otravě G-látkami.

Kombinace podání tabun a HI-6 zachovala ve striatu silnou až velmi silnou aktivitu s ložiskovými výpadky. Silná aktivita byla dále v bazolaterálních jádrech amygdaly a nuclei triangulares septi. Další jádra septa měla aktivitu střední nebo slabou, kortex rovněž slabou. Aktivita AChE v hippocampu dosáhla maximálně středních hodnot v ložiscích uvnitř lamina pyramidalis. V thalamu jevilo nejsilnější aktivitu jádro nc. reticularis následováno anteroventrálními jádry. Laterodorsální jádra thalamu měla jen střední aktivitu.
V hypothalamu jsme pozorovali silnou aktivitu AChE v area lateralis a střední aktivitu v nc. arcuatus, ostatní hypothalamická jádra měla slabou aktivitu. V mezencefalu byla silná aktivita v stratum intermediale colliculi superiores, na rozdíl od stratum superficiale. V nc. interpeduncularis vynikaly silnou aktivitou subnuclei rostrolaterales a dorsomediales oproti ostatním slabým podjádrům, což byl nález podobný otravě tabunem, kterou jsme popsali dříve (část 5.3.3 Popis histochemického obrazu otravy G-látkami). Z motorických jader hlavových nervů měla silnou aktivitu jádra X. a XII. nervu, jádra VII. a V. nervu měla střední aktivitu. V nuclei pontis se střídala ložiska silné a slabé aktivity AChE. Nuclei dorsales tegmenti měla poměrně silnou aktivitu, nc. ambiguus silnou, střední aktivitu měly retikulární formace, vestibulární a kochleární jádra, nc. cuneatus, nc. solitarius. V mozečkové kůře byla ložiska střední aktivity. Detekovali jsme také silnou aktivitu AChE ve fasciculus retroflexus a v průběhu VII. hlavového nervu.

Při podání kombinace tabunu a obidoximu se histochemický obraz v přední části mozku nelišil od předchozího popisu, pouze v kortexu byla nalezena slabá až střední aktivita.

V hippocampu byla téměř souvislá vrstva střední aktivity AChE v pyramidální vrstvě. Thalamus měl velmi silnou aktivitu v anterodorzálních a anterolaterálních jádrech. Ostatní jádra neprojevovala silnou aktivitu. Hypothalamus dosahoval středních hodnot aktivity AChE, s výraznější aktivitou v blízkosti 3. mozkové komory a v area lateralis. Zona incerta měla silnou aktivitu. Velmi silná aktivita byla v nucleus interpeduncularis v podjádrech popsaných u předchozí kombinace látek. Silnou aktivitu jsme sledovali v substantia nigra. V colliculi superiores byly ostrůvky velmi silné aktivity v hlubších šedých vrstvách a ostrůvky silné aktivity v povrchové šedé vrstvě. Motorická jádra ve kmeni měla silnou aktivitu, velmi silnou aktivitu měly nc. ambiguus, laterodorzální a dorzální jádra tegmenta a ložiskově nc. pontis. Aktivita AChE v retikulární formaci dosahovala středních hodnot. Granulární vrstva kůry mozečku měla téměř souvislou střední aktivitu. V bílé hmotě jsme nalezli silnou aktivitu ve fasciculus retroflexus a v průběhu VII. hlavového nervu.

Při podání tabunu v kombinaci s podáním látky K048 byla ve striatu ložiska silné aktivity AChE, převládala však ložiska slabé aktivity. V amygdale byla silná aktivita v bazolaterálních jádrech. Septální jádra a kortex měly slabou aktivitu. Aktivita pyramidové vrstvy v hipokampu téměř vymizela. V oblasti thalamu byla slabá aktivita ve všech jádrech, v hypothalamu dosáhl střední aktivity pouze nc. arcuatus. Zona incerta jevila slabou až střední aktivitu. Nc. interpeduncularis mělo neohraničená ložiska střední aktivity AChE, ostatní mezencefalické struktury měly aktivitu slabou. V pontomedulární oblasti jsme detekovali silnou aktivitu pouze v nucleus dorsalis nervi vagi, nc. ambiguus a v laterodorzálních a parabrachiálních jádrech tegmenta. Kůra mozečku měla slabou aktivitu.

5.6.3 Kvantifikace nálezu

Výsledky zjištěné kvantifikací histochemického vyšetření jsou uvedeny v tabulkách 12-13. Kontrolní hodnoty denzity pixelu, ke kterým se vztahují procentuální poměry uvádíme v podobě aritmetického průměru zde mimo tabulku: frontální kortex 184,1; hippocampus 219,9; hypothalamus 201,3; nucleus ruber 190,2; retikulární formace 222,5; septum 200,1; thalamus 223,9; amygdala 217,5; striatum 242,1.

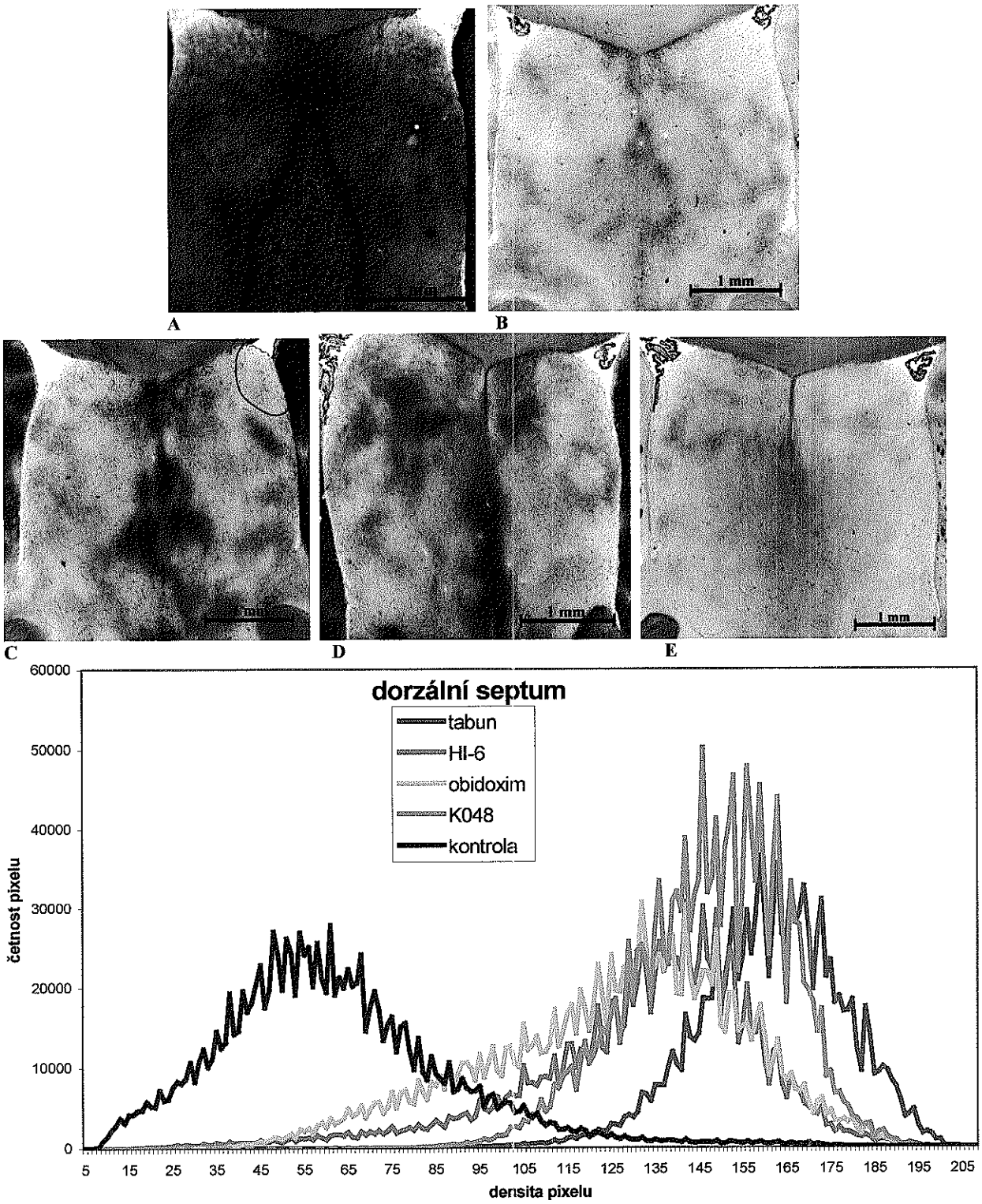
Pro obrazový doprovod byla vybrána oblast septa, nucleus ruber a thalamus (obr. 13-15). Z tabulkových hodnot i z histogramu v uvedených příkladech je patrné, že z vyšetřovaných antidot při otravě tabunem má ve většině jáder nejlepší účinek obidoxim. Méně je účinná látka HI-6. Látka K048 má slabý nebo žádný efekt s vyjímkou frontálního kortexu.

Posuzovaná oblast mozku	tabun	% z kontroly	tabun + HI-6	% z kontroly
Frontální kortex	66,1 ± 7,5	35,9	61,9 ± 10,4	33,7
Hippocampus	92,7 ± 7,1	42,1	123,6 ± 6,1 *	56,2
Hypothalamus	103,7 ± 7,2	51,5	138,1 ± 5,7 *	68,6
Nucleus ruber	123,0 ± 6,0	64,7	153,7 ± 8,1 *	80,8
Retikulární formace	148,0 ± 6,3	66,5	164,0 ± 5,8 *	73,7
Septum	95,0 ± 6,4	47,5	124,6 ± 4,7 *	62,2
Thalamus	117,3 ± 5,6	52,4	150,0 ± 5,6 *	67,0
Amygdala	98,0 ± 6,2	45,1	146,3 ± 6,0 *	67,3
Striatum	131,9 ± 7,4	54,5	204,7 ± 78,9 *	84,6

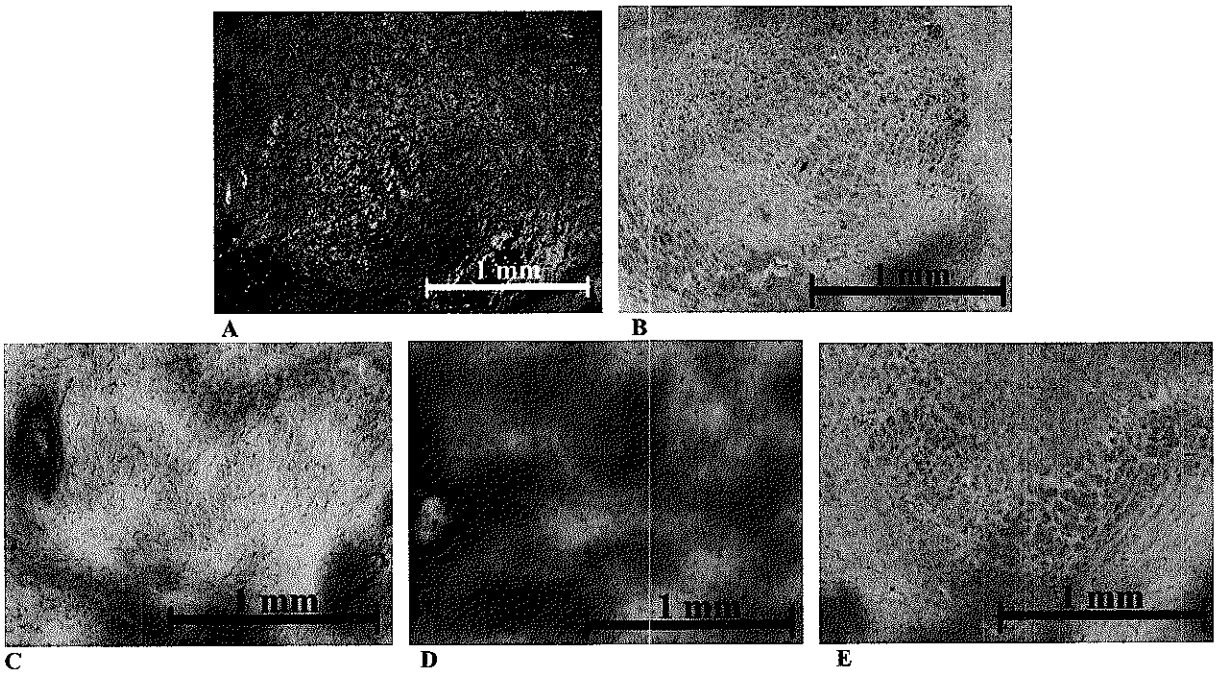
Tab. 12. Kvantifikace účinku tabunu a reaktivátoru AChE HI-6. Uvedené hodnoty jsou vypočítány jako rozdíl naměřené průměrné hodnota pixelu od 256. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota ± standardní odchylka. Hodnota ve sloupci „% z kontroly" je poměr hodnot ve sloupci nalevo ku hodnotám uvedeným ve sloupci „kontrola". Hodnoty označené hvězdičkou jsou signifikantně vyšší než ve skupině „tabun" ($p<0,05$).

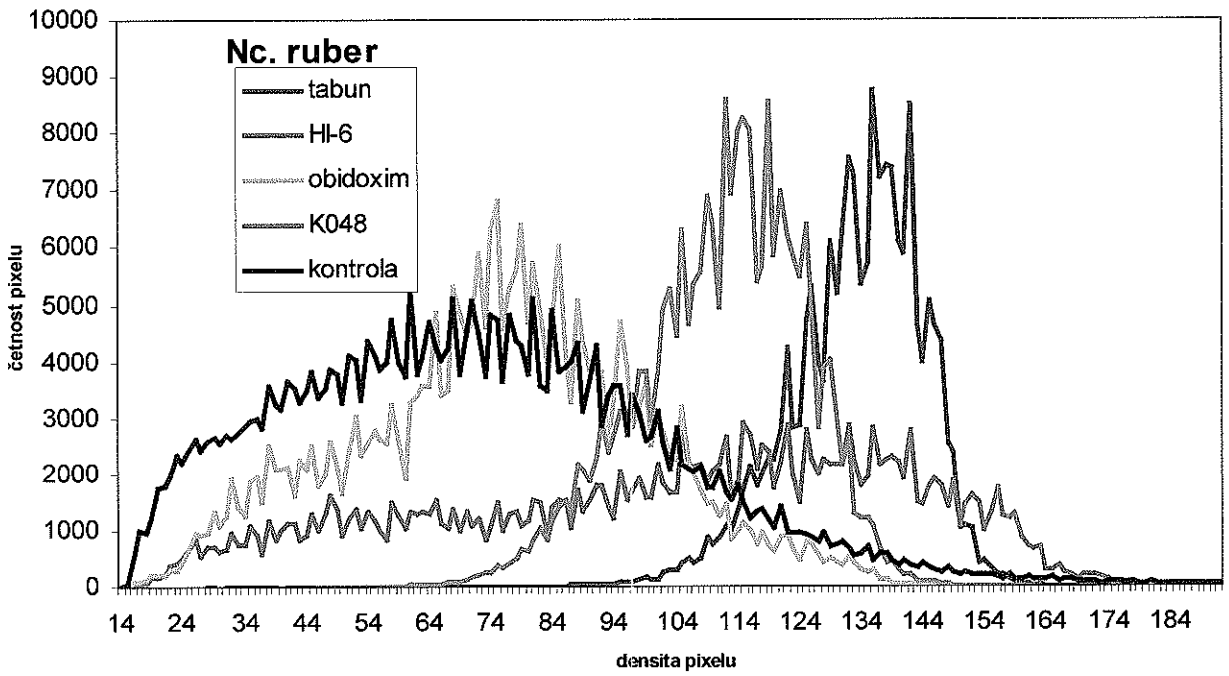
Posuzovaná oblast mozku	tabun + obidoxim	% z kontroly	tabun + K048	% z kontroly
Frontální kortex	88,7 ± 8,1 *	48,1	100,1 ± 4,8 *	54,4
Hippocampus	135,0 ± 5,9 *	61,4	99,0 ± 5,5 *	45,0
Hypothalamus	162,7 ± 7,7 *	80,8	104,9 ± 7,7	52,1
Nucleus ruber	180,0 ± 4,2 *	94,6	144,8 ± 8,3 *	76,1
Retikulární formace	173,9 ± 5,9 *	78,2	130,6 ± 4,1	58,7
Septum	130,6 ± 8,9 *	65,3	109,0 ± 4,8 *	54,5
Thalamus	118,9 ± 6,1	53,1	102,6 ± 6,9	45,8
Amygdala	116,2 ± 7,8 *	53,4	121,6 ± 14,1 *	55,9
Striatum	214,2 ± 8,9 *	88,5	153,2 ± 3,7 *	63,3

Tab. 13. Kvantifikace účinku obidoximu a K048 při otravě tabunem. Uvedené hodnoty jsou vyjádřeny stejným způsobem jako v předchozí tabulce.



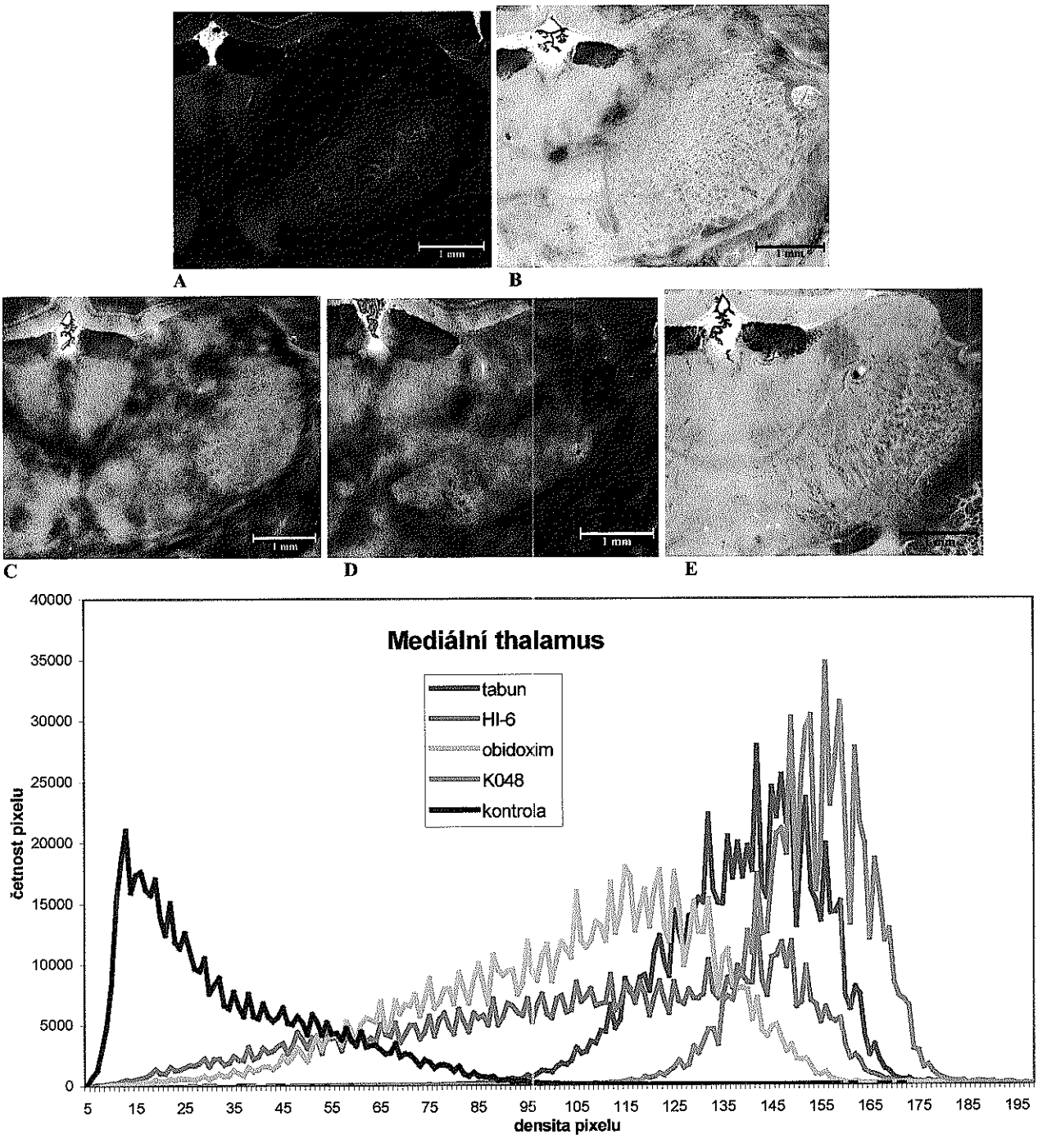
Obr. 13. Septum, aktivita AChE a AP. Řez v úrovni od bregmatu. A - kontrola, B - tabun, C – tabun + HI-6, D – tabun + obidoxim, E - tabun + K048, F – histogram. Hvězdička značí artefakt.





F

Obr. 14. Nucleus ruber, aktivita AChE a AP. Řez 5,6 mm dorzálně od bregmatu. A - kontrola, B - tabun, C – tabun + HI-6, D – tabun + obidoxim, E - tabun + K048, F – histogram.



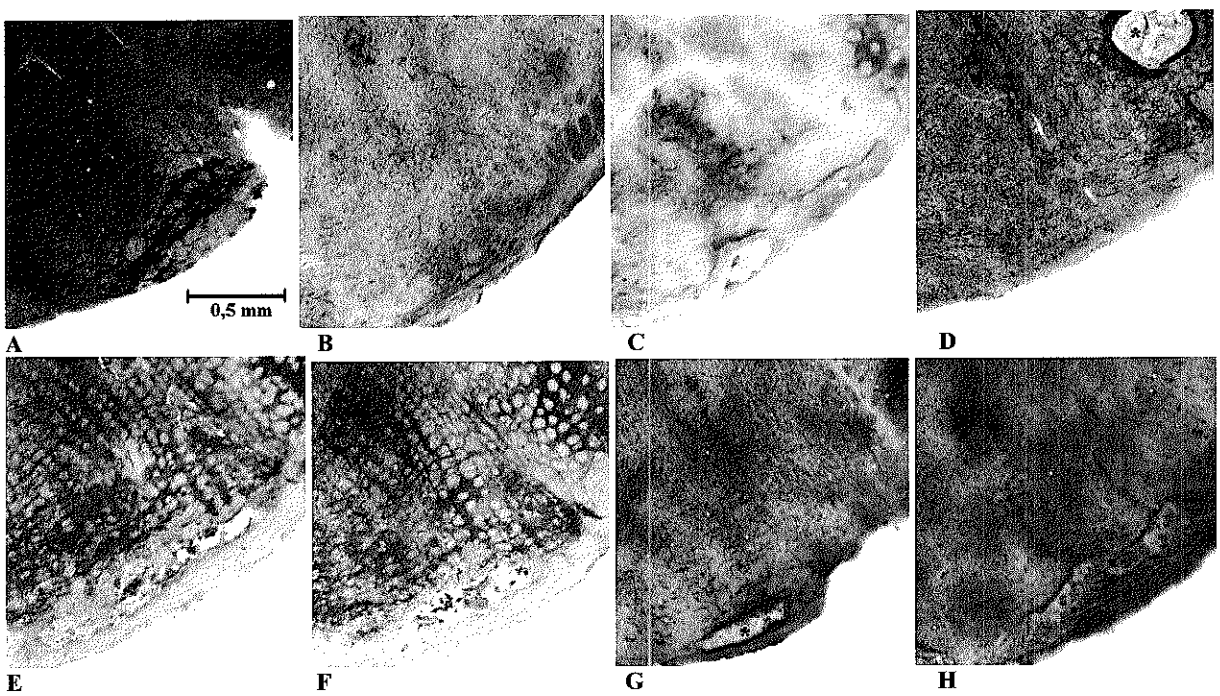
Obr. 15. Thalamus, aktivita AChE a AP. Řez 3,2 mm dorzálně od bregmatu. A - kontrola, B - tabun, C – tabun + HI-6, D – tabun + obidoxim, E - tabun + K048, F -- histogram.

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. Výsledky přinášíme ve formě tabulky (tab. 14).

skupina	cVRG	%	rVRG	%	Pre-Bötzinger	%	Bötzinger	%
Kontrola	212,1	100,0	200,4	100,0	215,3	100,0	209,1	100,0
Tabun	125,1	59,0	119,0	59,3	108,9	50,6	111,5	53,3
Soman	126,4	59,6	138,7	69,2	124,5	57,8	130,2	62,5
RVX	168,1	79,3	160,1	79,9	xxx	xxx	155,6	74,4
Huperzin+soman	154,9	73,0	167,2	83,4	xxx	xxx	xxx	xxx
Huperzin+RVX	157,3	74,0	145,2	72,4	156,7	72,8	148,6	71,1
Tabun+HI-6	134,5	63,4	132,3	66,0	131,5	61,1	135,0	64,6
Tabun+obidoxim	148,3	69,9	152,0	75,8	155,0	72,0	161,0	77,0

Tab. 14. Kvantifikace vyšetření podoblastí VRG u různých podaných látek a jejich kombinací. Uvedené hodnoty jsou vypočítány jako rozdíl naměřené průměrné hodnoty pixelu od 256 a jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr. Hodnota ve sloupci „%" je poměr hodnot ve sloupci nalevo ku hodnotě uvedené ve řádku „kontrola". xxx – kvantifikaci nebylo možno provést pro nedostatečný počet kvalitních vzorků.



Obr. 16. Nc. ambiguus (vlevo nahoře) a cVRG (uprostřed snímků). Aktivita AChE a AP, úroveň řezu 13,30 mm dorzálně od bregmatu. A - kontrola, B – tabun, C – soman, D – RVX, E - huperzin A + soman, F – huperzin A + RVX, G – tabun + HI-6, H – tabun + obidoxim. Hvězdička značí artefakt.

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. Výsledky získané kvantifikací histochemických preparátů v soustředných zónách kolem jmenovaných orgánů přinášíme ve formě tabulek (tab. 15-17).

Detailní pohled na eminentia mediana na spodině III. mozkové komory u porovnávaných experimentálních skupin představuje obrázek 17.

Eminentia mediana

zóny	kontrola	tabun	% z kontroly	tabun+HI-6	% z kontroly	tabun+ obidoxim	% z kontroly
do 0,1 mm	177,8	103,0	57,9	107,7	60,6	127,0	71,4
0,1 - 0,2 mm	179,8	100,5	55,9	121,4	67,5	139,7	77,7
0,2 - 0,3 mm	178,7	99,1	55,5	147,2	82,4	138,0	77,2
0,3 - 0,4 mm	178,0	99,8	56,1	143,9	80,8	143,6	80,7
0,4 - 0,5 mm	177,7	99,1	55,8	131,0	73,7	148,4	83,5

Tab. 15. Kvantifikace nálezu v okolí eminentia mediana. Uvedené hodnoty jsou vypočítány jako rozdíl naměřené průměrné hodnota pixelu od 256. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota.. Hodnota ve sloupci „% z kontroly" je poměr hodnot ve sloupci nalevo ku hodnotám uvedeným ve sloupci „kontrola".

Organum vasculosum laminae terminalis

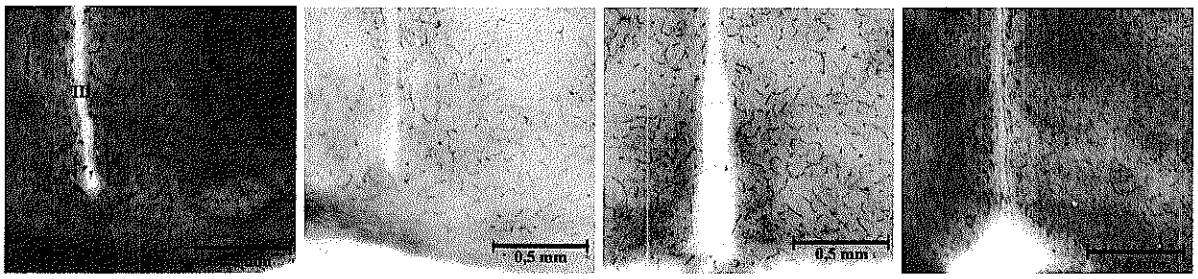
zóny	kontrola	tabun	% z kontroly	tabun+HI-6	% z kontroly	tabun+ obidoxim	% z kontroly
do 0,1 mm	175,4	102,3	58,3	98,4	56,1	67,0	38,2
0,1 - 0,2 mm	181,7	100,8	55,5	111,4	61,3	80,9	44,5
0,2 - 0,3 mm	179,0	110,7	61,8	130,1	72,7	93,0	52,0
0,3 - 0,4 mm	183,7	109,6	59,7	118,5	64,5	92,5	50,4
0,4 - 0,5 mm	186,1	107,9	58,0	123,6	66,4	92,7	49,8

Tab. 16. Kvantifikace nálezu v okolí OVLT. Hodnoty jsou uváděné stejným způsobem jako v předchozí tabulce.

Organum subcommisurale

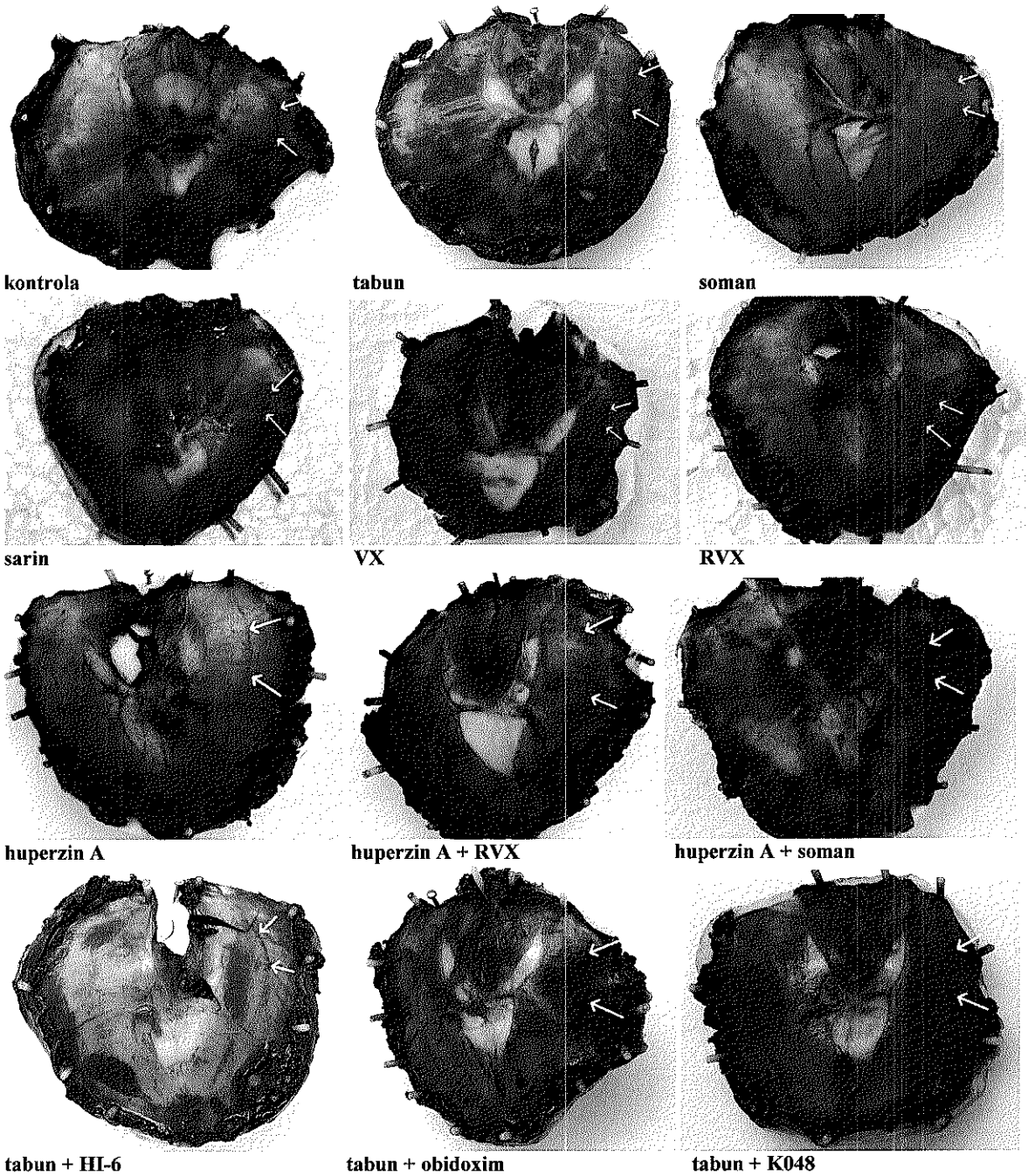
zóny	kontrola	tabun	% z kontroly	tabun+HI-6	% z kontroly	tabun+ obidoxim	% z kontroly
do 0,1 mm	212,1	106,2	50,1	71,8	33,9	108,2	51,0
0,1 - 0,2 mm	212,0	101,3	47,8	94,8	44,7	135,7	64,0
0,2 - 0,3 mm	220,7	115,7	52,4	101,8	46,1	154,5	70,0
0,3 - 0,4 mm	229,5	116,1	50,6	100,3	43,7	177,8	77,5
0,4 - 0,5 mm	236,0	113,3	48,0	90,7	38,4	174,8	74,1

Tab. 17. Kvantifikace nálezu v okolí organum vasculosum laminae terminalis. Hodnoty jsou uváděné stejným způsobem jako v tab. 15.



A B C D

Obr. 17. Eminentia mediana v úrovni 3 mm dorzálně od bregmatu. Aktivita AChE a AP. A - kontrola, B - tabun, C – tabun + HI-6, D – tabun +obidoxim. III. = 3. mozková komora, Arc = nucleus arcuatus, EM = eminentia mediana.



Obr. 18. Hrudní plocha bránice, kultivováno vcelku na AChE, šipky označují oblast terminálních plotének.

5.9 Histochemické změny na bránici

Na nervosvalových ploténkách bránice jsme nalezli 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 (obr. 18). Výsledky získané naši metodou nelze přesněji kvantifikovat, můžeme se proto omezit pouze na toto slovní hodnocení.

6. Diskuze

6.1 Metoda

V naší práci jsme chtěli prokázat oprávněnost užití kvantitativní histochemie a zjistit pomocí této metody detaily o toxickém působení inhibitorů AChE. 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. Mimo jiné je molekula AChE membránově vázaná, čímž je vhodná pro vyšetření „in situ". Heterogenita aktivity tohoto enzymu v mozku, stejně jako heterogenní inhibice AChE při otravě NPL a při léčbě této otravy, přímo vybízejí k použití této metody. Při všech pozitivech jsme si vědomi limitů kvantitativní histochemie. Otázka spolehlivosti a úskalí kvantifikace histochemických preparátů tvoří samostatnou část v literárním přehledu, proto ji na tomto místě nebudeme již více diskutovat.

Z důvodů korelace s biochemickým vyšetřením prováděným na Katedře toxikologie FVZ UO v Hradci Králové jsme metodu upravili ve třech následujích 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). De facto jsme měřili celkovou aktivitu cholinesteráz, přičemž ovšem BuChE se v mozku vyskytuje v řádově nižším množství a její funkce v mozku není zcela objasněna. Výsledky histochemického vyšetření tedy prezentujeme s určitou nepřesností jako aktivitu AChE.

2) Ohraničení jader mozku použitých pro kvantifikaci nálezu, tak jak jsme je publikovali a jak jsou též prezentovány v této práci, vycházejí z požadavků katedry toxikologie. 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 nejprudčí 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 1x LD_{50}, při pokusech s antidoty a profylaktikem byla dávka NPL zvýšena na 1,2 x 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. Též tyto látky, ač při případné intoxikaci OF chrání zdraví exponovaných osob, jsou samy o sobě toxické a mají tedy stanovenou svoji LD_{50}. S vyšší dávkou reaktivátoru stoupá jak reaktivační efekt na enzym, tak i toxický účinek. V praxi se používají takové dávky antidot, které odpovídají 2-10% LD_{50}. Při těchto dávkách je zaručen potřebný reaktivační účinek a zároveň je podání antidota ještě bezpečné. Stejné dávky se tudíž používají i ve většině experimentů in vivo (Kassa 2004a), které mají za úkol posoudit použitelnost antidot pro humánní použití.

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. Obě metody používají jako substrát acetylthiocholin, shodnou okolností stejně jako biochemické vyšetření

dle Ellmana. Hammond ve své práci zmiňuje, že mezi výsledky získanými oběma uvedenými histochemickými metodami není rozdíl (Hammond et al., 1996). Záleží čistě na zvyklosti laboratoře. Naše laboratoř se přiklonila k metodě Karnovsky-Roots na základě předchozí dlouhodobě dobré zkušenosti. Na ústní doporučení prof. RNDr. Dubového, CSc. z anatomického ústavu MU v Brně jsme vyzkoušeli také alternativní způsob kultivace, který se lišil delší dobou než 3 hodiny (přes noc) a v probíhal při teplotě ledničky a pH kultivačního roztoku 5,5–6. Tato metoda nám však nepřinesla žádné zlepšení výsledků ani usnadnění práce, a proto jsme práci nadále prováděli způsobem popsaným v části 4.1 Základní metodika.

Simultánní detekce alkalické fosfatázy (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. AP je též přítomna v cévách a její detekce barevně překryje endoteliální AChE. Tato dvojí detekce byla vyvinuta původně pro semikvantitativní hodnocení okem vyšetřujícího. Protože nám však vyhovovala pro lepší orientaci na mozkových řezech (AP v plexus choroideus značila komorový systém), zachovali jsme ji i pro kvantitativní hodnocení. Ověřili jsme si však nejdříve, že aktivita AP významně neovlivňuje CCD kamerou nasnímanou tmavost pixelů, dle které posuzujeme aktivitu AChE. Aktivita AChE je vyjádřena cihlově červeným odstínem, AP modrofialově. Digitální obraz je složen ze tří kanálů (červený, zelený, modrý), nabízela se tedy ještě možnost hodnotit pouze červený kanál. Nenašli jsme však žádný přínos takového postupu.

6.4 Výroba histochemických preparátů

Literatura doporučuje jako optimální tloušťku 10-14 mikrometrů (Hammond et al., 1996; Ma et al., 2001). Zvolili jsme sílu řezů 20 mikrometrů nejenom z důvodů snadnější manipulace, ale hlavně proto, že jsme tloušťku řezů přizpůsobili práci se silnými inhibitory AChE a snažili jsme se postihnout rozdíly v této inhibici. Při použití optimální tloušťky bychom zachovali lepší pronikání substrátu k enzymu v tkáňovém řezu, ale mohli bychom ztratit infomaci o rozdílech v aktivitě enzymu v místech se silnou inhibicí. Z toho důvodu jsou také kontrolní řezy s plnou aktivitou AChE mnohem tmavší než v literatuře, používající histochemii AChE na zmapování přirozené aktivity cholinesteráz v mozku.

Při lepení kryostatových řezů jsme vyzkoušeli dvě varianty, a to hovězí albumin a kamencovou želatinu. Pro kamencovou želatinu jsme se rozhodli proto, že lépe fixovala řezy na podložní sklíčko. Lepší přilnutí řezu na sklíčko bylo též důvodem použití par formolu k fixaci. Při vložení kryostatových řezů přímo do Bakerova roztoku nám řezy příliš často uplavaly. Prakticky jsme fixaci prováděli tak, že kryostatový řez na sklíčku jsme uložili do

Petriho misky naležato řezem dolů asi centimetr nad hladinu Bakerova roztoku. Teprve po minutě jsme preparát přenesli do tekutiny, kde fixace pokračovala po dobu 5 minut.

Každý řez určený pro histochemický preparát byl následován sousedním řezem určeným pro histologické barvení. Původní záměr provádět tyto sousední řezy v tloušťce 10μ nebylo možné z technických důvodů dodržet. Proto jsme oba řezy, určené jak k histochemické detekci tak k histologickému barvení, krájeli na tloušťku 20μm. Hematoxylinové řezy o této tloušťce byly příliš silné, než aby na nich bylo možno provádět posouzení histopatologických změn, a plnily proto pouze orientační úlohu.

Výroba preparátů z jednoho mozku představovala práci 3 laborantek po dobu asi 1 pracovního dne, dokumentace na jednotce mikroskop - počítač vyžadovala zhruba 1 pracovní den vyšetřujícího. Data byla snímána v maximální možné kvalitě, soubor snímků jednoho mozku byl velký 6-8 GB. Tyto údaje neuvádíme pouze pro zajímavost. Autoři popisující techniky ke kvantifikaci histochemie totiž porovnávají kromě spolehlivosti výsledků rovněž to, jestli metoda je časově či materiálně náročná. Podle našeho názoru tato metoda náročná je, zejména ve srovnání s biochemickým vyšetřením. Podává však mnohem cennější informaci, co se týče uložení a členění vyšetřovaných mozkových jader. Vzniklé obrázky lze archivovat k dalšímu použití. Na rozdíl od naší metody se při biochemickém vyšetření informace redukují pouze na jednorázové zjištění kvantitativního údaje. Proto se domníváme, že výše popsaný, časově náročný postup, se vyplácí.

6.5 Digitální analýza obrazu

Funkce optické denzity (jasu) a denzity pixelu je přibližně lineární. Ve skutečnosti se s vyššími hodnotami mírně zakřivuje. Pro zpřesnění provedli autoři (Hammond et al., 1996) nelineární regresi s rovnicí $y = (4{,}1x + 0{,}043x^2)/1000$, kterou použili pro korekci dat získaných z digitálního obrazu. V naší práci jsme tuto korekci pominuli. Museli bychom pravděpodobně provést vlastní kalibraci na řadu barevných roztoků o vzestupné koncentraci. Domníváme se, že přínos takového postupu by byl minimální a že lze vycházet z předpokladu, že denzita pixelu lineárně vzrůstá se skutečným jasem.

Software 3D-Doctor použitý k digitální analýze byl zvolen na základě osobního doporučení. Stejné nebo podobné funkce však má množství dalších dostupných grafických programů. Software 3D-Doctor umožňuje nejen provést analýzu v ohraničené oblasti (množství pixelů, jejich průměrná denzita, histogram), ale i převést data do tabulky v programu Microsoft Excel. V Excelu byl potom vyroben spojnicový graf jako názorné zobrazení histogramu. V tomto zobrazení mají křivky tvar podobný Gaussově křivce. Pro

naše účely má význam pouze poloha maxima vzhledem k ose x. Výška křivky nemá výpovědní hodnotu, z tvaru křivky lze však usuzovat na heterogenitu buněčné populace. Pro ilustraci změn aktivity AChE jsme v této práci použili pro každou měřenou látku či kombinaci látek data z toho řezu, který měl střední průměrnou hodnotu pixelu.

6.6 Interpretace výsledků

Při kvantifikaci histochemického nálezu v jednotlivých oblastech mozku si musíme uvědomit, že síla inhibice v tomto případě nevypovídá o toxicitě dané látky. Při pokusech bylo užito středních letálních dávek NPL, které se pohybují v rozmezí od 15 μg/kg u VX a RVX do 200 μg/kg u tabunu pro laboratorního potkana. Jinými slovy, srovnáváme účinek 15 μg/kg gramů V-látek a desetinásobné množství tabunu. Pokud některý z těchto silných inhibitorů acetylcholinesterázy jeví ve srovnání s ostatními NPL relativně malý pokles aktivity AChE v mozku, což se týká hlavně V-látek, znamená to, že jejich toxický účinek se projevuje jinde než v mozku. Oč menší je inhibiční účinek na AChE v mozku, o to větší je buď v periferní nervové soustavě, kde jsme kvantifikaci neprováděli, nebo se toxicita látky podílí na letalitě ještě jiným účinkem. Dále je třeba poznamenat, že střední toxická dávka pro experimentální akutní otravu se z praktického hlediska stanovuje do dvou hodin od aplikace, ale toxický účinek se může projevit i pozdější smrtí.

Jsme si vědomi rozdílu histochemického vyšetření a stanovení aktivity enzymu biochemickým způsobem, kde se uplatňuje kinetika enzymatické reakce v čase. Korelaci jsme hledali v % aktivity z kontrolního vyšetření. Nepokoušeli jsme se porovnávat absolutní čísla, čili stanovovat korelaci mezi aktivitou enzymu (vyjádřenou v μmol/min na gram vlhké tkáně) a hodnotou pixelu digitálního obrazu z našeho vyšetření. Tato korelace byla nabídnuta v práci Pamely Hammond (Hammond et al., 1996). Nechceme naši metodu přeceňovat a domníváme se, že by takové výsledky by již byly zatížené příliš velkou chybou.

6.7 Výsledky ověření metody

Jsme si vědomi toho, že vzhledem k malému počtu měření v ověřovacím pokusu nemůžeme našim výsledkům přikládat velký význam z pohledu statistického. Šlo především o testování použité laboratorní metody. 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 zabarvení při pokojové teplotě, naše osobní zkušenosti byly jiné - již během 2 týdnů jsme zaznamenali pokles intenzity zbarvení. Pokles průměrné denzity pixelu byl během 1 měsíce asi o 25 stupňů v 256 stupňové škále, a to i v případě uchování na tmavém místě. Proto jsme hodnocení všech vzorků prováděli do dvou dnů od zamontování preparátů.

Při měření denzity pixelu na sousedních řezech vycházela příznivě standardní odchylka. Do rozmezí hodnot se však promítly ojedinělé krajní hodnoty, které se vzdalovaly od průměrné hodnoty. K přesnosti výsledků by mohlo přispět, kdyby se v souboru měření vždy ignorovaly obě krajní hodnoty. Tuto úpravu jsme však nakonec neprováděli.

6.8 Výsledky korelace

Hodnota uvedená v tabulce ve sloupci „histochemie" je vypočítána jako rozdíl naměřené průměrné hodnoty pixelu od 256. Tento odečet má převést hodnoty tak, aby vyšší číslo znamenalo vyšší tmavost obrázků a tím přeneseně vyjadřovalo vyšší aktivitu enzymu. Linearita této stupnice je přitom zachována.

Kromě korelační křivky jsme k poměření histochemické a biochemické metody použili i zobrazení dle Blanda a Altmana. Toto zobrazení ilustruje shodu metod. Metody by nebyly v dobré shodě, pokud by body ve větší míře překračovaly limity dané dvěma standardními odchylkami nebo pokud by se výrazně kumulovaly na kladné nebo na záporné polovině osy y. V našem případě je větší množství bodů v oblasti kladných čísel, převaha však není výrazná a nepokládáme ji za důkaz systematické chyby. Korelaci i shodu metod hodnotíme jako dobré. 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. Jiným mechanismem by mohlo být vyčerpání substrátu z inkubačního média při silné aktivitě striata, ale tuto možnost nepředpokládáme.

6.9 Nález při otravě G-látkami a V-látkami

Pokud naše výsledky generalizujeme, při použití LD_{50} 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 LD_{50} daného NPL, která je u V látek několikrát nižší než u G látek (viz část 6.6 Interpretace výsledků). 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.

Ačkoliv obě testované V-látky mají podobnou chemickou strukturu i toxicitu, významně se liší v aktivitě k mozkové acetylcholinesteráze. Jejich střední inhibiční koncentrace (IC_{50}) pro potkaní AChE in vitro byla stanovena na $1{,}62 \times 10^{-9}$ M pro VX a 1×10^{-8} M pro RVX (Kuča et al., 2006). RVX tedy inhibuje mozkovou AChE zhruba šestkrát méně než VX. In vivo tento poměr však není tak vysoký, jak ukazují výsledky prezentované v této práci. Signifikantní rozdíl mezi účinkem obou látek byl shledán například v retikulární formaci, v kortexu a dalších oblastech mozku, ale ne v septu či v thalamu. Je těžké interpretovat rozdíl mezi oběma V-látkami. V případě výrazného rozdílu při in vitro experimentu se nemohou uplatnit fyzikálně chemické vlastnosti, jako například rozpustnost ve vodě, které jsou v případě RVX i VX velmi podobné (Carlsen, 2004). Rozdílný účinek in vivo může být zapříčiněn rozdílnou penetrací látky do mozkových struktur.

6.10 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 inhibitorem AChE, je huperzin A selektivní inhibitor AChE a proniká přes HEB do centrální nervové soustavy. Další výhodou huperzinu A je, že je málo toxický a navíc chrání neurony před toxickým účinkem glutamátu (Patočka, 1999). Má vysokou biologickou dostupnost při podání per os (Wang et al., 2006). Huperzin byl testován in vitro a prokázal schopnost protekce vůči somanu (Lallement et al., 2002; Gordon et al., 2005). Podobný výsledek byl potvrzen i in vivo na různých živočišných druzích včetně primátů (Wang et al., 2006). Profylaktická dávka 500 μg/kg byla navržena na základě literárních údajů z experimentů (Grunwald et al., 1994).

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. V-látky se uplatňují hlavně v periferii na nervosvalové ploténce. Ačkoliv periferní účinek jsme nehodnotili kvantitativně, z našeho vyšetření bránice nevyplývá žádné zlepšení ve skupině předléčené huperzinem proti aplikaci samotné podání RVX. Naproti tomu při podané kombinaci huperzin – soman je vidět zřetelné zvýšení aktivity AChE na bránici oproti skupině otrávené somanem. 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.

Z řady vyšetřovaných jader mozku poněkud vybočoval nucleus ruber, který jevil nízkou inhibici AChE somanem i huperzinem. Je možné, že k tomuto jádru uloženému v hloubi mezencefala inhibitory AChE hůře pronikají. Z mnoha výsledků lze soudit, že jedy i léčebně použité látky odlišně penetrují do různých jader a oblastí mozku. Stejně je ale možné, že nucleus ruber obsahuje ve zvýšeném poměru frakci AChE rezistentní k účinkům inhibitorů.

6.11 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. Nálezy 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, 2005a). V našem experimentu se histochemický obraz při použití látky K048 v řadě oblastí mozku nelišil od morfologického obrazu neléčené otravy tabunem. Podobné hodnoty jsme získali ze všech tří experimentálních zvířat. Počet tří zvířat v experimentální skupině je relativně nízký, proto jsme se snažili

omezit jakékoliv náhodné chyby tím, že jsme u každého jedince hodnotili stejnou oblast vždy na větším množství řezů. 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.

Ke statistickému hodnocení změn aktivity AChE v experimentech s profylaktikem a antidoty jsme použili nepárový t-test. Použití párového testu nebylo vhodné, neboť jsme porovnávali výsledky, které nepocházely od totožných jedinců.

6.12 Vyšetření jader respiračního centra

V experimentech s NPL jsme prokázali různorodou inhibici AChE v různých strukturách mozku po intoxikaci G-látek a V-látek, po podání profylaktika a po podání antidot. Mezi strukturami více senzitivními k inhibitorům AChE mohou být části mozku 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 RF hraje významnou roli v dýchání, neboť se zde nalézá komplex respiračních center, která generují impulzy pro dýchací svaly. Útlum těchto center je považován za primární příčinu smrti. Proto i pokles aktivity AChE v této oblasti po intoxikaci OF s narušením cholinergního přenosu je pokládán za příčinu poklesu ventilace a rozvoje akutní respirační insuficience vedoucí až ke smrti. Za prahovou hodnotu je přitom považován pokles aktivity AChE na 5–10% (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. Pontinní centra zahrnují nuclei parabrachiales v dorsální části tegmenta a sousední Kölliker-Fuseho jádro (Chamberlin et Saper, 1994). Do VRG se počítá v kraniokaudálním pořadí Bötzingerův komplex, rVRG a cVRG. Tato medulární jádra kaudálně navazují na nucleus nervi facialis a jsou rozložena podél nc. ambiguus, ventrálně od něj. Dle popisu v Paxinosově atlasu potkaního mozku zhruba odpovídají nucleus rostroventrolateralis retikulární formace (Chitravanshi et Sapru, 1999). V oblasti mezi Bötzingerovým komplexem a rVRG (12,5 - 13 mm dorzálně od bregmatu) se nachází tzv. pre-Bötzingerův komplex. Bylo prokázáno, že v tomto místě sídlí buňky, které mají funkci pacemakeru a generují vzruchy pro dýchací svaly (Smith et al., 1991; Sun et al., 1998). Jejich spontánní aktivita je tlumena či stimulována řadou aferentních signálů. Celý respirační systém je složitě propojen jak vnitřně, tak

s okolními jádry (Ramirez et al., 2004; Gaytán et al., 1996). Do komplexu je napojena řada dalších jader RF, např. nc. gigantocellularis, i jader vzdálenějších, např. nc. fastigii mozečku (Xu et al., 2001). Na tomto zapojení se podílí i cholinergní systém (Kubin et Fenik, 2004).

Využili jsme toho, že naše metoda umožňuje zhodnotit aktivitu AChE in situ, a pátrali jsme po změnách aktivity AChE v podoblastech VRG. Pokusili jsme se detekovat rozdíl mezi účinkem použitých látek, který by mohl přispět k objasnění působení NPL či vlivu léčebných látek na rozvoj akutní respirační insuficience. Zajímalo nás, zda některý z inhibitorů nebo reaktivátorů AChE nevykazuje selektivní účinek na komplex respiračních center. Z archivovaných snímků z předchozích pokusů jsme zjistili, že oblast VRG má jen mírně vyšší aktivitu než okolní RF. Kvantitativní výsledky u jednotlivých vyšetřovaných skupin svým poměrem ke kontrole odpovídají inhibici v okolní retikulární formaci. Neprokázali jsme tedy žádnou změnu, která by naznačovala, že některá z vyšetřovaných látek při svém efektu přednostně účinkuje na určitou strukturu v komplexu medulárních respiračních center.

6.13 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). Cirkumventrikulární orgány tak mají možnost registrovat i ovlivňovat složení krve a mozkomíšního mozku. Příkladem může být detekce nežádoucích látek v tělních tekutinách a vyvolání reflexu zvracení, což je činnost charakteristická pro area postrema. Podle funkce lze cirkumventrikulární orgány dělit na senzorické a sekretorické. Do první skupiny patří organum vasculosum laminae terminalis, organum subfornicale a area postrema. K sekretorickým orgánům se počítá eminentia mediana, organum subcomisurale, corpus pineale; někdy se začleňuje též neurohypofýza a plexus choroideus (Johnson et Gross, 1993; Fry et al., 2007). Přesná poloha těchto orgánů je popsána v literatuře, jednotlivé orgány jsou rovněž zakresleny v Paxinosově atlasu krysího mozku (Paxinos et Watson, 1987).

Vzhledem k popsaným změnám v HEB jsme předpokládali, že by v těchto orgánech mohlo dojít ke zvýšenému průniku oximů do mozkové tkáně z cévního řečiště, případně z likvoru. O obtížném průchodu oximových reaktivátorů AChE do mozku bylo psáno v literárním přehledu. 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, závislé na dávce OF (Petrali et al., 1991; Abdel-Rahman et al., 2002). O průniku oximů do likvoru nejsou v dostupné literatuře informace. Likvor představuje další specifický kompartment v oblasti mozku. 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.

Tyto otázky jsme chtěli zodpovědět měřením aktivity AChE v blízkosti cirkumventrikulárních orgánů. Domníváme se, že naše metoda, umožňující posoudit aktivitu AChE in situ na mozkových řezech, je k tomu velmi vhodná. Vyšli jsme 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. Pro kvantifikaci histochemického obrazu jsme zvolili oblast eminentia mediana, OVLT a subkomisurální orgán. V okolí těchto orgánů jsme však žádný zjevný nárůst aktivity AChE nepozorovali. V okolí eminentia mediana byla aktivita AChE zvýšená přítomností nc. arcuatus hypothalamu, zejména ve vzorcích s terapeuticky použitou HI-6 látkou, tento nález však nepovažujeme průkaz pronikání oximu cestou eminentia medialis. Nc. arcuatus je vybaven normálními endoteliemi se spojením typu „tight junction" a má charakteristiky normální HEB (Fry et al., 2007). Vyšetření ostatních cirkumventrikulárních orgánů jsme provedli bez kvantifikace. Ani v jejich okolí jsme nenašli histochemické změny, které by svědčily pro zvýšený prostup oximů.

6.14 Histochemické změny na bránici

Vyšetření bránice ukázalo pokles aktivity při použití nervově paralytických látek oproti kontrolnímu vzorku. Výsledky dále potvrzují příznivé působení huperzinu A při expozici somanu a účinnost léčby obidoximem při otravě tabunem. Nedetekovali jsme rozdíl mezi V-látkami, o nichž se předpokládá, že působí periferně, a G-látkami. Ačkoliv se uvádí, že v případě V-látek hraje větší roli inhibice nervosvalového přenosu než centrální inhibice, při otravě RVX jsme i na bránici našli patrnou aktivitu AChE. Je tedy možné, že při působení RVX se významně uplatňuje ještě jiný toxický účinek, než je inhibice AChE.

6.15 Možnosti dalšího pokračování práce

V našich experimentech jsme pracovali pouze se vzorky ze zvířat po otravě střední letální dávkou NPL nebo 1,2 x LD_{50}. LD_{50} 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 LD_{50}) či naopak supraletální dávkou (2x LD_{50}).

Podobným způsobem jsme abstrahovali od sledování vývoje inhibice AChE v čase. Všechny mozky byly odebrány ve stejném časovém rozvrhu, zvířata byla utracena po 30 minutách, pokud do té doby sama nezahynula. Přitom z výsledků biochemických pokusů v literatuře vyplývá, že inhibice způsobená V-látkami probíhá pozvolněji než při použití G-látek, jak v krvi, tak v mozku. Na druhou stranu je pravda, že dle literatury se po dosažení 30 minut dostává inhibice AChE téměř do maxima i u V-látek při s.c. podání (Shih et al., 2005). Usmrcením zvířat po 5 minutách, 10 min apod. by bylo by možné sledovat histochemickou metodou vývoj inhibice AChE v mozku při akutní otravě i při předléčení akutní otravy. Neméně přínosná by byla studie, při níž by byl sledován časový vývoj obnovy aktivity AChE v mozkových jádrech při subletální dávce NPL. Při použití somanu, který rychle dealkyluje a neumožňuje proto spontánní reaktivaci AChE, by taková studie vlastně prokazovala syntézu AChE de novo.

7. Závěry

Splnění cílů dizertační práce vyžadovalo osvojit si histologické a histochemické techniky, digitální analýzu obrazu a další práci s výpočetní technikou, v neposlední řadě pak porozumět problematice statistické analýzy. S týmem laboratorních pracovníků jsem vypracoval metodu kvantitativní histochemie vhodnou k posouzení účinku NPL na nervový systém a účinku antidot a profylaktických látek proti těmto jedům.

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. 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 stávají méně zřetelnými.

V-látky inhibují mozkovou AChE méně než G-látky, což platí zejména pro RVX látku. Při použití LD_{50} 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 LD_{50} VX, nebo RVX, ačkoliv obě látky mají podobnou chemickou strukturu a fyzikálně chemické vlastnosti.

Aktivita AP ve vyšetřovaných vzorcích byla silná v endoteliích, v area postrema a v epifýze, velmi silná v plexus choroideus mozkových komor. Její aktivitu neovlivnily žádné z podaných látek.

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

1. Abdel-Rahman A., Shetty a.K., Abou-Donia M.B. Acute exposure to sarin increases blood brain barrier permeability and induces neuropathological changes in the rat brain: dose-responce relationships. Neuroscience 113 (2002), s. 721-741
2. Abou-Donia M.B. Organophosphorus Pesticides. In: Handbook of Neurotoxicology. Chang L.W., Dyer R.S., editors. Marcel Dekker, New York (1995), s. 419-474
3. Abu-Qare A.W., Abou-Donia M.B. Sarin: health efects, metabolism, and methods of analysis. Food and Chemical Toxicology 40 (2002), s. 1327–1333
4. Anderson D.R., Harris L.W., Woodard C.L., Lennox W.I. The effect of pyridostigmine pretreatment on oxime efficiacy against intoxication by soman or VX in rats. Drug and Chemical Toxicology 15 (1992), s. 285-294
5. Antonijevic B., Stojiljkovic M.P., Bokonjic D., Maksimovic M., Nedeljkovic M. Effect of memantine on the permeability of the mice blood-brain barrier in soman poisoning. Toxicology Letters 144 (2003), s. 121
6. Ashani Y., Grauer E., Grunwald J., Ilon N., Raveh L. Current capabilities in extrapolating from animal to human BChE to detoxify organophosphates. In: Structure and function of cholinesterases and related proteins. Doctor B.P., Taylor P., Quinn D.M., Rotundo R.L., Gentry M.K., editors. Plenum Press, New York (1998), s. 255-260
7. ATSDR Toxicological profile for Malathion. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Atlanta, GA, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service (2003), URL http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp154.pdf [31.3.2008]
8. Bachmann K. Predicting toxicokinetic parameters in humans from toxicokinetic data acquired from three small mammalian species. Journal of Applied Toxicology 9 (1989), s. 331-338
9. Bajgar J. Complex view on poisoning with nerve agents and organophosphates. Acta Medica 48 (2005), s. 3-21
10. Bajgar J. Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie. Novinky v medicíně 34. Avicenum, Praha (1985), s. 7-40
11. Bajgar J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. Advances in Clinical Chemistry 38 (2004), s. 151-216

12. Bajgar J. Používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu: od historie k současnosti. Nucleus HK, Hradec Králové (2006), 182 stran
13. Bajgar J. Současný stav znalostí o účinku somanu. Vojenské Zdravotnické Listy, 66 (1997), s. 40-43
14. Bajgar J. Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. Vojenské Zdravotnické Listy 41 (1972a), s. 78-80
15. Bajgar J. The influence of inhibitors nad other factors on cholinesterases. Sborník Vědeckých Prací LFUK-HK 34 (1991), 77 stran
16. Bajgar J. Time course of acetylcholinesterase inhibition in the medulla oblongata of the rat by O-ethyl S-(dimethylaminoethyl) methylphonothioate in vivo. British Journal of Pharmacology 45 (1972b), s. 368-371
17. Bajgar J., Fusek J., Kuca K., Bartosova L., Jun D. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. Mini Reviews in Medicinal Chemistry 7 (2007a), s. 461-466
18. Bajgar J., Hajek P., Karasova J., Slizova D., Krs O., Kuca K., Jun D., Fusek J., Capek L. Inhibition of Acetylcholinesterase in Different Structures of the Rat Brain Following Soman Intoxication Pretreated with Huperzine A. International Journal of Molecular Sciences 8 (2007b), s. 1165-1176
19. Bajgar J., Hajek P., Slizova D., Krs O., Fusek J., Kuca K., Jun D., Bartosova L., Blaha V. Changes of acetylcholinesterase activity in different rat brain areas following intoxication with nerve agents: Biochemical and histochemical study. Chemico-Biological Interactions 165 (2007c), s.14–21
20. Bajgar J., Patočka J. Mechanismus účinku a biologický efekt vysoce toxických organofosfátů a karbamátů. In: Extrémně toxické nízkomolekulární syntetické jedy. Sborník ze sympozia toxikologické chemie Československé společnosti chemické ČSAV, VLVDÚ, Hradec Králové (1979), s. 61-84
21. Bajgar J., Portmann R. The treatment of intoxication with selected organophosphates and carbamate: Comparison of different therapeutic approaches. Proceedings CBMTS-Industry II; The First Congress on Chemical nad Biological Terrorism, Dubrovnik (2001), s. 180-184
22. Balali-Mood M., Shariat M. Treatment of organophosphate poisoning. Experience of nerve agents and acute pesticide poisoning on the effects of oximes. The Journal of Physiology 92 (1998), 375-378

23. Bartošová L. Otravy nervově paralytickými látkami: co o nich víme? Československá fyziologie 55 (2006), s. 66-75
24. Benishin C.G., Carroll P.T. Multiple forms of choline-O-acetyltransferase in mouse and rat brain: Solubilization and characterization. Journal of Neurochemistry 41 (1983), s. 1030-1039
25. Benschop H.P., De Jong L.P.A. Toxicokinetics of nerve agents, In: Chemical Warfare Agents: Toxicity at Low Levels. Somani S.M., Romano J.A., editors. CRC Press, Boca Raton (2001), s. 25-81
26. Bielavský J., Kassa J., Elsnerová I., Dejmek L. Cholinesterase reactivators derived from pyridine-2-carbaldoxime. Collection of Czechoslovak Chemical Communication 63 (1998), s. 199
27. Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1 (1986), s. 307-310
28. BRENDA - Comprehensive Enzyme Information System, URL http://www.brenda-enzymes.info (2008) [31.3.2008]
29. Bright J.E., Inns R.H., Tuckwell N.J., Griffiths G.D., Marrs T.C. A histochemical study of changes observed in the mouse diaphragm after organophosphate poisoning. Human and Experimental Toxicology 10 (1991), s. 9-14
30. Brimijoin S., Hammond P., Rakonczay Z. Two-site immunoassay for acetylcholinesterase in brain, nerve, and muscle. Journal of Neurochemistry 49 (1987), s. 555
31. Brimijoin S., Lockridge O. Butyrylcholinesterase and cocaine. In: Butyrylcholinesterase: its function and inhibition. Giacobini E., editor. Publisher Martin Dunitz, London (2003), s. 101-110
32. Cabal J., Kuca K., Kassa J. Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase. Pharmacology and Toxicology 95 (2004), 81-86
33. Carlsen L. A QSAR approach to physico-chemical data for organophosphates with special focus on known and potential nerve agents. BioChem Press, Internet Electronic Journal of Molecular Design, http://www.biochempress.com (2004)
34. Carmona G.N., Jufer R.A., Goldberg S.R., Gorelick D.A., Greig N.H., Yu Q.-S., Cone E.L., Schindler C.W. Butyrylcholinesterase accelerates cocaine metabolism: in vitro and in vivo effects in nonhuman primates and humans. Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals 28 (2000), s. 367–371

35. Carpentier P., Lambridinis, Blanchet G. Early dendritic changes in hippocampal pyramidal neurones (field CA1) of rats subjected to acute soman intoxication: a light microscopic study. Brain Research, 541 (1991), s. 293-299
36. Carpentier P., Lambrinidis M., Blanchet G. Seizure-related opening of the blood-brain barrier induced by soman: possible correlation with the acute neuropathology observed in poisoned rats. Neurotoxicology 11 (1990), s. 493-508
37. Coult D.B., Marsh D.J., Read G. Dealkylation studies on inhibited acetylcholinesterase. Biochemical Journal 98 (1966), s. 869-873
38. Davson H., Segal M.B. The blood-cerebrospinal fluid barrier. In: Physiology of the CSF and Blood-Brain Barriers. Davson H., Segal M.B., editors. CRC Press, London (1996), s. 25-47
39. Dawson R.M. Review of oximes available for treatment of nerve agent poisononig. Journal of Applied Toxicology 14 (1994), s. 317-331
40. Day T., Greenfield S.A. A non-cholinergic trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurones in vitro: Molecular mechanism. Neuroscience 111 (2002), s. 649-656
41. De Bleecker J.L., Lison D., van den Abeele K., Willems J., Reuck J. Acute and subacute organophosphate poisonings in the rat. Neurotoxicology 15 (1994), s. 341-348
42. De Reuck, J., Willems, J. Acute parathion poisoning: Myopathic changes in the diaphragm. Journal of Neurology 208 (1975), s. 309-314
43. 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
44. Doležal P., Vachek J., Hrabálek A. In vitro transdermal permeation of a cholinesterase reactivator HI-6. In: Perspectives in percutaneous penetration. Brain R.K., Walters K.A., editors. STS Publishing, Cardiff (1988), s. 84
45. 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
46. Eyer P. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. Toxicological Reviews 22 (2003), s. 165-190
47. Eyer P., Worek F. The determination oh human erythrocyte acetylcholineserase (ery-AChE) in a modified Ellman assay. The 3-rd International CMBTS, Spiez (2000), proceeding No. 30

48. Ferrari R., Russell A.S. The problem of Gulf War syndrome. Medical Hypotheses 56 (2001), s. 697-701
49. Fišar Z., Jirák R. Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie. Grada, Praha (2001), 315 stran
50. 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
51. Gaytán S.P., Calero F., Núñez-Abades P.A., Morillo A.M., Pásaro R. Pontomedullary efferent projections of the ventral respiratory neuronal subsets of the rat. Brain Research Bulletin 42 (1997), s. 323–334
52. Geršl V., Bajgar J., Krs O., Hrdina R., Palicka V., Mazurova Y. Changes in cholinesterase activities after Daunorubicin administration to rabbits. Human and Experimental Toxicology 15 (1996), s. 834–838
53. Giacobini E. Butyrylcholinesterase: its role in brain function. In: Butyrylcholinesterase: its function and inhibition. Giacobini E., editor. Publisher Martin Dunitz, London (2003), s. 1-19
54. Giacobini E. Cholinesterase inhibitor therapy stabilizes symptoms of Alzheimer disease. Alzheimer Disease and Associated Disorders 14 (2000), supplementum s. 3-10
55. Glick D., Ben-Moyal L., Soreq H. Genetic variation in butyrylcholinesterase and the physiological consequences for acetylcholinesterase function. In: Butyrylcholinesterase: its function and inhibition. Giacobini E., editor. Publisher Martin Dunitz, London (2003), s. 55-65
56. 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 in vivo exposure to soman. Chemico-Biological Interactions 157 (2005), s. 239-246
57. Grange-Messent V., Bouchaud C. Effect of soman on cerebral astrocyte plasma membranes: a freeze-fracture study. Neuroscience Letters 178 (1994), s. 77-80
58. Greaves P. Histopathology of preclinical toxicity studies: Interpretation and relevance in drug safety evaluation. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1990), 824 stran
59. Grubič Z., Zajc-Kreft K., Brank M., Maš ., Kolem R., Miranda A.F. Control levels of acetylcholinesterase expression in the mammalian skeletal muscle. Chemico-Biological Interactions 119–120 (1999), s. 309–319

60. Grunwald J., Raveh L., Doctor B.P., Ashani Y. Huperzine as a pretreatment candidate drug against nerve agent toxicity. Life Sciences 54 (1994), s. 991-997
61. Gupta R.C. Brain regional heterogeneity and toxicological mechanisms of organophosphates and carbamates. Toxicological Mechanisms and Methods 14 (2004), s. 103-143
62. Gupta R.C., Goad J.T., Milatovic D., ettbarn W.-D. Biochemical and histochemical alterations following acute soman intoxication in the rat. Toxicology and Applied Pharmacology 87 (1987), s. 393-402
63. Hackley B.E., Steinberg G.M., Lamb J.C. Formation of potent inhibitors of AChE by reaction of pyridinaloximes with isopropyl methylphosphonofluoridate. Archives of Biochemistry 80 (1959), s. 211-214
64. 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
65. Hammond P.I., Kern C., Hong F., Kollmeyer T.M., Pang Y.P., Brimijoin S. Cholinesterase reactivation in vivo with a novel bis-oxime optimized by computer-aided design. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 307 (2003), s. 190-196
66. Herink J., Krejčová G., Bajgar J., Svoboda Z., Květina J., Živnú P., Palička V. Cyclosporine inhibits acetylcholinesterase activity in selected parts of the rat brain. Neuroscience Letters 339 (2003), s. 251–253
67. Hozman J., Bernas M., Klíma J., Dvořák P. Zpracování obrazové informace. [skriptum] ČVUT, Praha (2006)
68. Chamberlin N.L., Saper C.B. Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. Journal of Neuroscience 14 (1994), s. 6500–6510
69. 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
70. Israel M., Lesbats B. The use of bioluminiscence techniques in neurobiology with emphasis to the cholinergic systém. In: Neurochemistry: A Practical Approach. Turne A.J., Bachelard H.S., editors. IRL Press, Washington (1987), s. 113-125
71. Jeyaratnam J. Pesticide poisoning as a global health problem. World Health Statistics Quarterly 43 (1990), s. 139-144

72. Jiang, H.L., Luo X.M., Bai D.L. Progress in clinical, pharmacological, chemical and structural biological studies of Huperzine A: a drug of traditional Chinese medicine origin for the tratment of Alzheimer´s disease. Current Medicinal Chemmistry 10 (2003), s. 2231-2252
73. Johnson A.K., Gross P.M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. FASEB 7 (1993), s. 678-686
74. Kaliste-Korhonen E., Tuovinen K., Hänninen O. Interspecies differences in enzymes reacting with organophosphates and their inhibition by paraoxon in vitro. Human Experimental Toxicology 15 (1996), s. 972-978
75. Karnovsky M. J., Roots L. A "direct coloring" thiocholine method for cholinesterases. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 12 (1964), s. 219-221
76. Kassa J. Non-specific effects of organophosphorus inhibitors of cholinesterases. Vojenské Zdravotnické Listy 67 (1998), s. 15-19
77. Kassa J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology 40 (2002a), s. 803-816
78. Kassa J. The influence of the time of antidotal treatment administration on its effectiveness against tabun-induced poisoning in mice. Acta Medica 47 (2004a), s. 111-114
79. 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 (2005a), s. 87-90
80. Kassa J. Vliv opakované antidotní terapie na toxicitu somanu u myší. Vojenské Zdravotnické Listy, 66 (1997a), s. 44
81. 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
82. Kassa J., Cabal J., Bajgar J., Szinicz L. The choice: HI-6, pralidoxime, or obidoxime against nerve agents? ASA Newsletter 97-4 (1997b), s. 16-18
83. 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
84. Kassa J., Fusek J. The influence of oxime selection on the efficacy of antidotal treatment of soman-poisoned rats. Acta Medica 45 (2002b), s. 19-27

85. Kassa J., Koupilová M., Herink J., Vachek J. The long term influence of low-level sarin exposure on behavioral and neurophysiological functions in rats. Acta Medica 44 (2001), s. 21-27
86. Kassa J., Kuca K., Cabal J., Jun D., Bartosova L., Kunesova G., Dohnal V. A Complex Process of the Development of New Acetylcholinesterase Reactivators – From Prediction to in Vivo Evaluation. Journal of Medical Chemical, Biological and Radiological Defense 3 (2005b), s. 1-9
87. 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 (2004b), s. 171-175
88. Khodakovskaja O.A., Vodolazskaja N.A., Glukhova L.D., Timofeeva S.I., Polezina A.S., Dvoretskaja S.I., Malochina E.I., Gobulev I.N. Early diagnostics of delayed neurotoxicity. Toxicology Letters 144 (2003), Suppl. s. 133
89. Kodíček M., Karpenko V. Biofyzikální chemie. Academia, Praha (2000), 337 stran
90. Koelle G.B., Thampi N.S., Han M.S., Olajos E.J. Histochemical demonstration of neutoxic esterase. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 37 (1989), s. 589-596
91. König J.F.R., Klippel R.A. The rat brain: A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Williams and Wilkins, Baltimore (1963)
92. Kubin L. Fenik V. Pontine cholinergic mechanisms and their impact on respiratory regulation. Respiratory Physiology and Neurobiology 143 (2004), s. 235-249
93. Kuča K., Bielavsky J., Cabal J., Kassa J. Synthesis of a potential reactivator of acytylcholinesterase 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(carbamoylpyridinium) propane bromide. Tetrahedron Letters 44 (2003a), s. 3123-3125
94. Kuča K., Cabal J., Kassa J., Jun D., Hrabinová 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
95. Kuča K., Jun D., Cabal J., Hrabinová M., Bartošová L., Opletalová V. Russian VX: inhibition and reactivation of acetylcholinesterase and its comparison with VX-agent. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 98 (2006), s. 389-394
96. Kuča K., Kassa J. A comparison of the ability of a new bispyridinium oxime 1-(hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(carbamoylpyridinium)butane dibromide and currently used oximes to reactivate nerve agent-inhibited rat brain acetylcholinesterase

by in vitro methods. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 18 (2003b), s. 529-535

97. Kugler P. Quantification of enzyme activities in brain sections by microphotometry. The International Journal of Biochemistry 23 (1991), s. 657-661
98. Kutty K.M., Payne R.H. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. Journal of Clinical Laboratory Analysis 8 (1994), s. 247–250
99. 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
100. Lassiter T.L., Barone S., Padilla S. Ontogenetic differences in the regional and cellular acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in the rat brain. Developmental Brain Research 105 (1998), s. 109–123
101. Layer P.G., Willbold E. Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. Progress in Histochemistry and Cytochemistry 29 (1995), s. 1–94
102. Lim D.K., Porter A.B., Hoskins B., Ho I.K. Changes in Ach levels in the rat brain during subacute administration of diisopropylfluorophosphate. Toxicology and Applied Pharmacology 90 (1987), s. 477-489
103. Little P.J., Scimeca J.A., Martin B.R. Distribution of [3H]diisopropylfluorophosphate, [3H]soman, [3H]sarin, and their metabolites in mouse brain. Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemical 16 (1988), s. 515-520
104. Lojda Z. Základy histochemického průkazu enzymů (příprava roztoků a pufrů). ÚDVZP, Brno (1970), 110 stran
105. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T. H. Enzyme Histochemistry - A Laboratory Manual. Springler-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979), 339 stran
106. Lotti M. The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. Critical Reviews in Toxicology 21 (1992), s. 465-487
107. Lüllman H., Mohr K., Wehling M. Farmakologie a toxikologie. Grada Publishing, Praha (2002), 694 stran
108. 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
109. Maroni M., Bleecker M.L. Neuropathy target esterase in human lymphocytes and platelets. Journal of Applied Toxicology 6 (1986), s. 1-7

110. Marrs T.C., Maynard R.L., Sidell F.R. Chemical Warfare Agents. Toxicology and Treatment. John Wiley & Sons Ltd., New York (1996), 243 stran
111. Maršálek B. Sinice a jejich toxiny. URL http://www.sinice.cz (2002) [31.3.2008]
112. Masson P., Froment M.-T., Fortier P.-L., Visicchio J.-E., Bartels C.F., Lockridge O. Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. Biochemica and Biophysica Acta 1387 (1998), s. 41–52
113. Matoušek, J. Vysoce toxické organické sloučeniny fosforu. In: Extrémně toxické nízkomolekulární syntetické jedy. Sborník ze sympozia toxikologické chemie Československé společnosti chemické ČSAV, VLVDÚ, Hradec Králové (1979), s. 7-39
114. McDonough J.H., Shih T.-M. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent–induced seizure and neuropathy. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 21 (1997), s. 559-579
115. Messent V.G., Bouchaud C. Effects of soman on cerebral astrocyte plasma membranes: a freeze-fracture study. Neuroscience Letters 178 (1994), s. 77-80
116. Michalek H., Pintor A., Fortuna S., Bisso G.M. Effects of diisopropylfluorophosphate on brain cholinergic system of rats at early developmental stages. Fundamental and Applied Toxicology 5 (1985), s. S204-S212
117. Michel H.O. An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 34 (1949), s. 1564-1568
118. Miš K., Zajc-Kreft K., Grubič Z. Localization of cells expressing AChE mRNA in rat striatum using nonradioactive in situ hybridization. Chemico-Biological Interactions 119-120 (1999), s. 327-331
119. Moore W.J. Fyzikální chemie. SNTL, Praha (1979), 976 stran
120. Munro N.B., Ambrose K.R., Watson A.P. Toxicity of the organophosphate chemical warfare agents GA, GB, VX: Implications for public protection. Environmental Health Perspectives 102 (1994), s. 18-38
121. Nakao M., Suita S., Tomoaki T., Hirose R., Shima Y. Fourteen-year experience of acetylcholinesterase staining for rectal mucosal biopsy in neonatal Hirschsprung's disease. Journal of Pediatric Surgery 36 (2001), s. 1357-1363
122. Nenner M. Simultaneous determination of acetylcholinesterase /EC 3.1.1.7/ activity in the whole blood plasma, and erythrocytes with the automatic titrator. Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie 8 (1970), s. 537-540

123. Parveen M., Kumar S. Effect of DDVP on the histology and AChE kinetics of heart muscles of Rattus norvegicus. Journal of Environmental Biology 22 (2001), s. 257-261
124. Patočka J. Kinetics of hydrolysis of acetylthiocholine by oximes. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 38 (1973), s. 3685-3693
125. Patočka J. Může stará čínská droga pomoci pacientům s Alzheimerovou chorobou? Psychiatrie 3 (1999), s. 23-24
126. Patočka J., Bielavský J. Kinetic and thermodynamic parameters of reactivation of O-isopropyl-methylphosphorylated rat brain acetylcholinesterase by asymmetric bisquarternary 4-pyridine aldoximes. Collection of Czechoslovak Chemical Communication 40 (1975), s. 1794
127. 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
128. Patočka J., Jun D., Kuča K. In vitro inactivation of rat brain acetylcholinesterase by DSP-4 and its derivates OS-21 and OS-23 and protective activity of Tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine). Acta Medica 48 (2005), s.145-148
129. Patočka J., Kuča K., Jun D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. Acta Medica 47 (2004), s. 215–228
130. Paxinos G., Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press (1987)
131. Pazdernik T.L., Emerson M.R., Cross R., Nelson S.R., Samson F.E. Soman-induced seizures: Limbic activity, oxidative stress and neuroprotective proteins. Journal of Applied Toxicology 21 (2001), s. 87-94
132. Perry E. Cholinergic mechanisms and cognitive decline. European Journal of Anaesthesiology, 15 (1998), s. 768-773
133. 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. 331-338
134. Polhuijs M., Langeberg J.P., Benschop H.P. New method for retrospective detection of exposure to organophosphorus anticholinesterases: application to alleged sarin victims of Japanese terrorists. Toxicology and Applied Pharmacology 146 (1997), s. 156-161
135. Prymula R. Biologický a chemický terorismus – informace pro každého. Grada, Praha (2002), 152 stran

136. Radic Z., Reiner E., Taylor P. Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: Inhibition by substrates and coumarin derivates. Molecular Pharmacology 39 (1991), s. 98-104
137. Ramirez J.M., Tryba A.K., Peňa F. Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. Current Opinion in Neurobiology 14 (2004), s. 665-674
138. Redinbo M.R. Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery. Biochemical Society Transactions 31 (2003), s. 620-624
139. 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
140. Sakurada K., Matsubara K., Shimizu K., Shiono H., Seto Y., Tsuge K., Yoshino M., Sakai I., Mukoyama H., Takatori T. Pralidoxime iodide (2-PAM) penetrates across the blood-brain barrier. Neurochemical Research 28 (2003), s. 1401-1407
141. Sasaki M. An ultra-micro assay of serum cholinesterase with m-nitrophenol indicator. Rinsko Byori 12 (1964), s. 555-558
142. Satar S., Satar D., ap O., Koseoglu Z., Kaya M. Ultrastructural changes in rat liver treated with pralidoxime following acute organophosphate poisoning. The Mount Sinai Journal of Medicine 71 (2004), s. 405-410
143. Scarepo H.M., Dmochowski R.R. Muscarinic receptors: what we know. Current Urology Reports 4 (2003), s. 421-428
144. Scarsella G., Toschi G., Bareggi S.R., Giacobini E. Molecular forms of cholinesterases in cerebrospinal fluid, blood plasma, and brain tissue of the beagle dog. Journal of Neuroscience Research 4 (1979), s. 19-24
145. Scremin O.U., Shih T.-M., Li M.G. Mapping of cortical metabolic activation in soman-induced convulsion in rats. Brain Research Bulletin 43 (1997), s. 425-434
146. Shih M.L., McMonagle J.D., Dolzine T.W., Gresham V.C. Metabolite pharmacokinetics of soman, sarin and GF in rats and biological monitoring of exposure to toxic organophosphorus agents. Journal of Applied Toxicology 70 (1996), s. 779-786
147. 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
148. Schneider F., Steenland K., Hernandez B., Willson B., Krieger R., Spencer J., Margetich S. Monitoring peach harvest workers exposed to azinphosmethyl residues in

Sutter County, California, 1991. Environmental Health Perspectives 102 (1994), s. 580-585

149. 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
150. Slížová D., Krs O., Bajgar J., Pospíšilová B. Changes in microvascularization of some rat organs following soman poisoning. Sborník Vědeckých Prací LFUK (Hradec Králové) 38 (1995), s. 115–122
151. Smith J.C., Butera R.J., Koshiya N., Del Negro C., Wilson C.G., Johnson S.M. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. Science 254 (1991), s. 726–729
152. Somani S.M., Dube S.N. Physostigmine-An overview as pretreatment drug for organophosphate intoxication. International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology 27 (1989), s. 367-387
153. Storm-Mathisen J. Quantitative histochemistry of acetylcholinesterase. Journal of Neurochemistry 17 (1970), s. 739-750
154. Stoward P.J. The Past, present, and future of quantitative histochemistry. In: Histochemistry: The widening horizons of its applications in the biomedical sciences. Stoward P.J., Polak J.M, editors. John Wiley & Sons Ltd., New York (1981), s. 263-280
155. Stoward P.J., Pearse A.G.E. Histochemistry theoretical and applied. Volume 3: Enzyme histochemistry. Churchill Livingstone, Edinburgh (1991), 728 stran
156. Structure Probe, Inc., URL http://www.2spi.com (2006) [11.6.2006]
157. 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. 204-221
158. Ševelová L., Vachek J., Bajgar J. Inhalation apparatus for generating sarin and soman toxic vapors. Acta Medica 46 (2003), s. 157-161
159. Thullbery M.D., Cox H.D., Schule T., Thompson Ch.M., George K.M. Differential localization of acetylcholinesterase in neuronal and non-neuronal cCells. Journal of Cellular Biochemistry 96 (2005), s. 599-610
160. Tonkopii V. Oxidative stress in the mechanism of organophosphates neurotoxicity. Toxicology Letters 144 (2003), s. 132
161. Tryphonas L., Clement J.G. Histomorphogenesis of Soman-Induced Encephalocardiomyopathy in Sprague-Dawley Rats. Toxicologic Pathology, 23 (1995), s. 393-409

162. Tryphonas L., Clement J.G. Soman toxicity: Morphogenesis of CNS and heart lesions. CB Medical Treatment Sympozium I, the 5-8th December 1994, NC Labs, Spiez, Switzerland (1994), s. 225-226
163. Tryphonas L., Clement J.G. Soman-induced encephalopathy and cardiomyopathy in rats: A pharmacological study. US Army Medical Defense Bioscience Review, the 10-13th May 1993, Baltimore (1993), s. 495-500
164. Tuovinen K., Kaliste-Korhonen E., Raushel F.M., Hanninen O. Success of pyridostigmine, physostigmine, eptastigmine and phosphotriesterase treatments in acute sarin intoxication. Toxicology 134 (1999), s. 169-178
165. Urban R., Líškovská E. Histochemický obraz inhibice acetylcholinesterázy a morfologické změny v organismu u otrav látkami s nervově paralytickým účinkem. Učební text VLVDÚ, Hradec Králové (1977), 43 stran
166. Vacek Z. Histologie a histologická technika. Avicenum, Praha (1972), 320 stran
167. Van Helden H.P.M., Busker R.W., Melchers B.C.P., Bruijnzeel P.L.B. Pharmacological effect of oximes: how relevant are they? Archives of Toxicology 70 (1996), s. 779-786
168. Volpicelli L.A., Levey A.I. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes incerebral cortex and hippocampus. Progress in Brain Research 145 (2004), s. 59-66
169. 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
170. Wiener, S.W., Hoffman, R.S. Nerve agents: a comprehensive review. Journal of Intensive Care Medicine 19 (2004), s. 22-37
171. Williams B.R., Nazarians A., Gill M.A. A review of rivastigmine: a reversible cholinesterase inhibitor. Clinical Therapeutics 25 (2003), s. 1634-1653
172. Winter G.D. Cholinesterase activity determination in an automated analysis system. Annals of the New York Academy of Sciences 87 (1960), s. 629-635
173. Worek F., Diepold C., Eyer P. Dimethylphosphoryl-inhibited human cholinesterases: Inhibition, reactiovation and aging kinetics. Archives of Toxicology 73 (1999), s. 7-14
174. Worek F., Kirchner T., Backer M., Szinicz L. Reactivation by various oximes of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus compounds. Archives of Toxicology 70 (1996), s. 497-503
175. Worek F., Reiter G., Eyer P., Scinicz L. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. Archives of Toxicology 76 (2002), s. 523-529

176. Wright C.I., Geula C., Mesulam M.-M. Neuroglial cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. Annals of Neurology 34 (1993), s. 373–384
177. Wynn Z.J., Cummings J.L. Cholinesterase inhibitor therapies and neuropsychiatric manifestations of Alzheimer's disease. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 17 (2004), s. 100-108
178. Xu F., Zhou T., Gibson T., Frazier D.T. Fastigial nucleus-mediated respiratory responses depend on the medullary gigantocellular nucleus. Journal of Applied Physiology 91 (2001), s. 1713-1722