

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Diplomová práce

In vitro reaktivace cholinesteras inhibovaných pesticidy

In vitro reactivation of cholinesterases after pesticides inhibition

Vedoucí práce: doc. RNDr. Veronika Opletalová, PhD.

Školitel: RNDr. Miroslav Pohanka, PhD.

Hradec Králové 2010

Lucie Drtinová

Poděkování

Děkuji doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. za vedení, cenné rady a připomínky při vypracování vlastní diplomové práce. Největší dík patří mému školiteli RNDr. Miroslavu Pohankovi PhD. Příjemnou spolupráci a nezištnou pomoc při zpracovávání dat experimentu, kontrolu obsahu diplomové práce a zasvěcení do publikační činnosti. A na neposledním místě Martině Hrabínové a celému kolektivu na Katedře toxikologie FVZ ÚO za skvělé pracovní podmínky k získání experimentálních dat.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem.
Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování
čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně
citovány.

V Hradci Králové 19. 4. 2010

.....
Podpis

Souhrn

In vitro reaktivace cholinesteras inhibovaných pesticidy

Organofosforové pesticidy jsou toxické látky komerčně dodávané jako insekticida pro ochranu zemědělských komodit, protiepidemických opatření atd. Použití pesticidů je v České republice regulováno zákonem, a v rámci celé Evropské unie je trendem sledovat a regulovat používání přípravků s obsahem pesticidů. V diplomové práci jsem hodnotila účinnost nově připravených oximových reaktivátorů acetylcholinesterasy (AChE) za použití standardní spektrofotometrické metody a multikanálového spektrofotometru. Po experimentálním testování schopnosti inhibovat AChE jsem vybrala tři pesticidy schopné vazby na AChE bez metabolické aktivace: paraoxon ethyl, paraoxon methyl a DFP. Následně jsem experimentálně sledovala schopnost 78 vybraných oximových reaktivátorů *in vitro* obnovit aktivitu AChE po předchozí inhibici. Podařilo se dokázat, že DFP inhibovanou AChE lze reaktivovat s vysokou účinností za pomoci monokvartérních reaktivátorů, ale i biskvartérní reaktivátory jsou rovněž účinné. Naproti tomu se paraoxon ethyl a stejně tak i paraoxon methyl ve větší míře daly reaktivovat pouze biskvartérními reaktivátory. Počet oximových skupin se nezdá být důležitým faktorem předurčujícím účinnost těchto reaktivátorů pro paraoxon methyl a ethyl. Závěrem lze říci, že v rámci experimentů jsem vybrala a do *in vivo* testů doporučila vhodné a vysoce účinné oximové reaktivátory.

Summary

***In vitro* reactivation of cholinesterases after pesticides inhibition**

Organophosphate pesticides are toxic substances supplied commercially as insecticides in order to protect agricultural commodities, for suppression of epidemic events etc. The use of pesticides in the Czech Republic is strongly regulated by law similarly as in the whole EU. The regulation is aimed at monitoring and regulating the use of products containing toxic pesticides. In this diploma work, I measured the efficacy of previously synthesized oxime reactivators using the standard spectrophotometric method and multi-channel spectrophotometer. After experimental testing, the ability of selected pesticides to inhibit acetylcholinesterase (AChE) was assessed. I choose three pesticides that are capable of binding to AChE without any metabolic activation. It was paraoxon ethyl, paraoxon methyl, and DFP. Subsequently, I experimentally observed the ability of 78 selected oximes reactivators to restore AChE activity *in vitro*. I proved that the DFP inhibited AChE can be reactivated with high efficacy using monopyridinium reactivators but bispyridinium reactivators are also suitable. In contrast to DFP, paraoxon ethyl as well as paraoxon methyl inhibited AChE was reactivated with only bispyridinium reactivators. Number of oxime groups isn't significantly important factor in the efficacy of these reactivators for recovery of AChE activity after paraoxon methyl and ethyl inhibition. In a conclusion, the most suitable oxime reactivators were chosen and recommended for the future *in vivo* tests.

Obsah

Seznam zkratek	8
1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1. ENZYMY – CHOLINESTERASY	11
2.1.1 <i>Acetylcholinesterasa (AChE)</i>	11
2.1.2 <i>Butylcholinesterasa (BuChE)</i>	13
2.2. SUBSTRÁT – ACETYLCHOLIN (ACh)	14
2.2.1 <i>Funkce ACh v organismu</i>	14
2.2.2 <i>Syntéza a přenos v organismu</i>	14
2.3. RECEPTORY ACh.....	15
2.3.1 <i>Muskarinové receptory</i>	16
2.3.2 <i>Nikotinové receptory (nAChR)</i>	17
2.4. PESTICIDY	18
2.4.1 <i>Historie organofosforových pesticidů</i>	18
2.4.2 <i>Mechanismus účinku vybraných pesticidů (OFI a karbamátů)</i>	19
2.4.3 <i>Organofosforové pesticidy (ireverzibilní inhibitory AChE)</i>	20
2.4.4 <i>Karbamáty (reverzibilní inhibitory AChE)</i>	23
2.5. AKUTNÍ OTRAVA ORGANOFOSFOROVÝMI PESTICIDY	24
2.6. CHRONICKÁ OTRAVA OFI	24
2.7. PROFYLAXE	25
2.8. TERAPIE	26
2.9. ANTIDOTA	27
2.9.1 <i>Atropin</i>	27
2.9.2 <i>Oximy</i>	27
2.9.3 <i>Sérová cholinesterasa (přesněji pseudocholinesterasa, EC 3.1.1.8.)</i>	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1. SEZNAM CHEMIKÁLIÍ	30
3.2. METODIKA PRŮBĚHU STANOVENÍ REAKTIVACE	31
3.2.1 <i>Chemikálie a vybavení</i>	32
3.2.1.1 <i>Charakterizace ELISA readeru</i>	32
3.2.2 <i>Schéma měření</i>	33
3.2.3 <i>Výpočet reaktivace</i>	33
3.3. VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI	34
3.3.1 <i>Inhibice vlivem rozpouštědla</i>	34
3.3.2 <i>Výběr OF inhibitorů AChE</i>	34
3.3.3 <i>Reaktivace inhibované AChE paraoxon methylem, paraoxon ethylem a DFP</i>	36
3.4. STRUKTURNÍ VZORCE POUŽITÝCH REAKTIVÁTORŮ	39

4. DISKUZE	47
5. ZÁVĚR.....	51
6. PŘÍLOHY	52
Literatura.....	53

Seznam zkratek

AČR	armáda České republiky
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
ATP	adenosintrifosfát
BuChE	butyrylcholinesterasa
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CWC	Chemical Weapons Convention
DFP	diisopropylfluorofosfát
EHS	Evropské hospodářské společenství
HEB	hematoencefalická bariéra
ChE	cholinesterasa
IP3	inositoltrifosfát
mAChR	muskarinový receptor
nAChR	nikotinový receptor
NPL	nervově paralytické látky
OF	organofosforový
OFI	organofosforový inhibitor
OPCW	Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons
PS	polystyren
VACht	vezikulární acetylcholinový transportér

1. Úvod a cíl práce

Tato diplomová práce je zaměřena na *in vitro* výběr nově připravovaných oximových reaktivátorů acetylcholinesterasy (AChE) vhodných k obnově enzymové aktivity po předchozí inhibici organofosforovými pesticidy. Pro vlastní vykonání práce je třeba provést nejen řádnou rešeršně kompilační činnost a optimalizovat měření za použití multikanálové spektrofotometrie, ale i následně experimentálně hodnotit účinnost testovaných látek reaktivovat AChE inhibovanou vybranými organofosforovými pesticidy.

Pokud mluvíme o pesticidech, máme na mysli širokou skupinu látek hubících škůdce. Pokud jsou látky schválené k užití Ministerstvem zemědělství na základě posudku vypracovaného odbornou komisí Ministerstva zdravotnictví, mohou být komerčně dostupné ve specializovaných částech obchodních řetězců zabývajících se otázkou ochrany rostlin před hmyzem, plevelnými rostlinami, houbami a hlodavci. Z důvodu možných náhodných otrav těmito látkami je velmi důležité informovat o nebezpečnosti těchto přípravků.

V zemích Evropské unie a jiných vyspělých zemích je jejich použití přísně kontrolováno, ale v některých chudých afrických a asijských zemích je nekontrolované používání dodnes časté. U nás je používání pesticidů regulováno §39 zákona č. 326/2004 Sb. a doprovodnou vyhláškou Státní rostlinolékařské zprávy. Obecné intence jsou nařízeny Evropskou unií a to směrnicí 91/41/EHS. Nicméně i přísná regulativa nezabrání všem náhodným otravám pramenícím z chybné manipulace s toxickými přípravky a jejich nevhodnou aplikací. Léčba otrávených jedinců není dostatečně zvládnuta, a proto stále probíhá intenzivní výzkum v oblasti přípravy nových účinných látek.

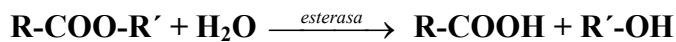
Cílem této práce bude nejen výběr vhodných oximových reaktivátorů pro paraoxon methylem, paraoxon ethylem a DFP inhibovanou AChE, ale i mapování strukturních požadavků ovlivňujících schopnost reaktivátorů obnovit aktivitu inhibovaného enzymu. Následně budou, pro potřebu Katedry

toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, navrženy některé perspektivní reaktivátory k *in vivo* testování.

2. Teoretická část

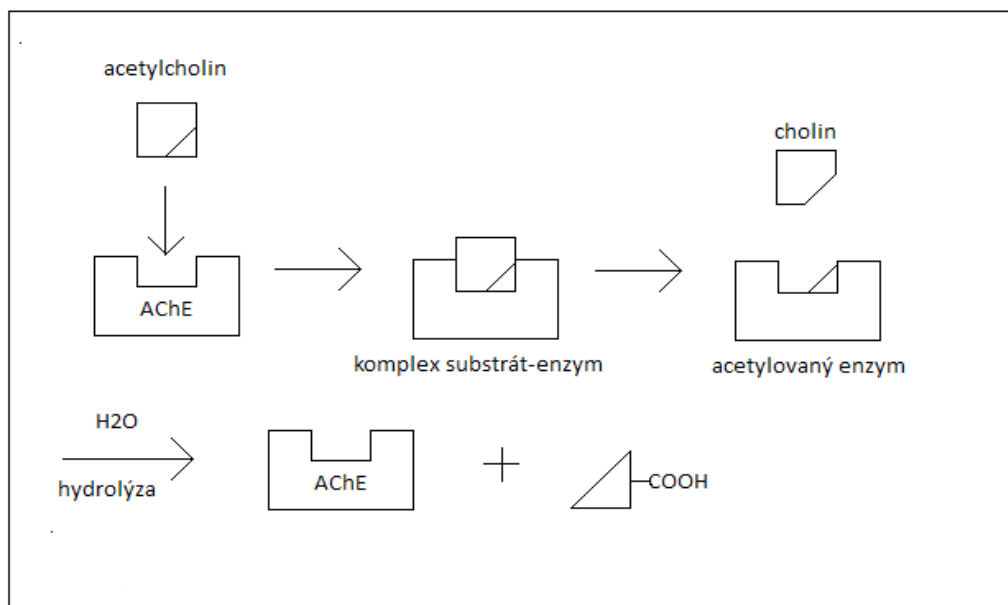
2.1. Enzymy – CHOLINESTERASY

Cholinesterasy jsou enzymy patřící do skupiny hydrolas (EC 3.) štěpících esterovou vazbu (podskupina esteras EC 3.1.). Rychleji hydrolyzují estery cholinu než jiné alifatické či aromatické estery. Jsou citlivé vůči různým inhibitorům, např. organofosforovým inhibitorům (OFI) a fysostigminu (eserinu – indolovému alkaloidu ze semen liány *Physostigma venenosum*). Tyto enzymy katalyzují reakci:



2.1.1 Acetylcholinesterasa (AChE)

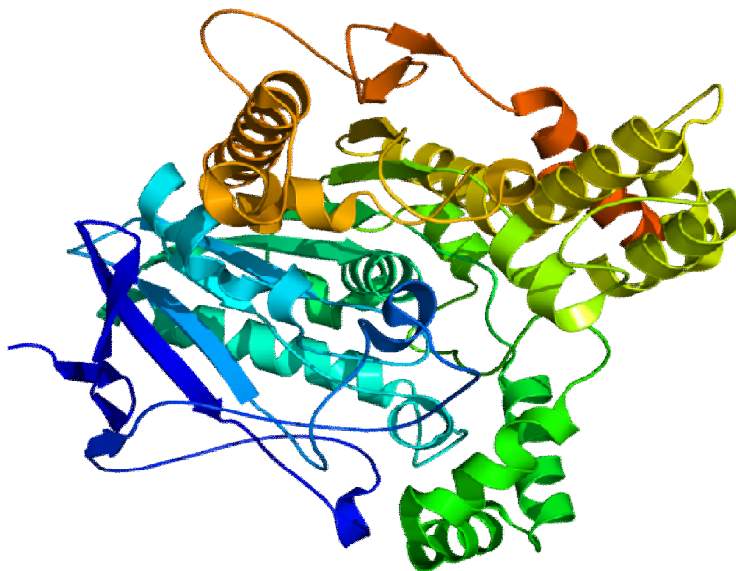
AChE je enzym přítomný především v nervové tkáni, svalu a červených krvinkách. Katalyzuje hydrolýzu acetylcholinu (ACh) na cholin a kyselinu octovou [1]. Rozkladem ACh se snižuje jeho působení na synapsi. Hydrolýza substrátu probíhá katalyticky ve více stupních. ACh se nejprve naváže svým kvartérním dusíkem na α -aniontovou část enzymu a karboxylem na esterové místo molekuly.



Obr. 1: Schéma odbourávání acetylcholinu AChE.

2.1.1.1. Struktura AChE

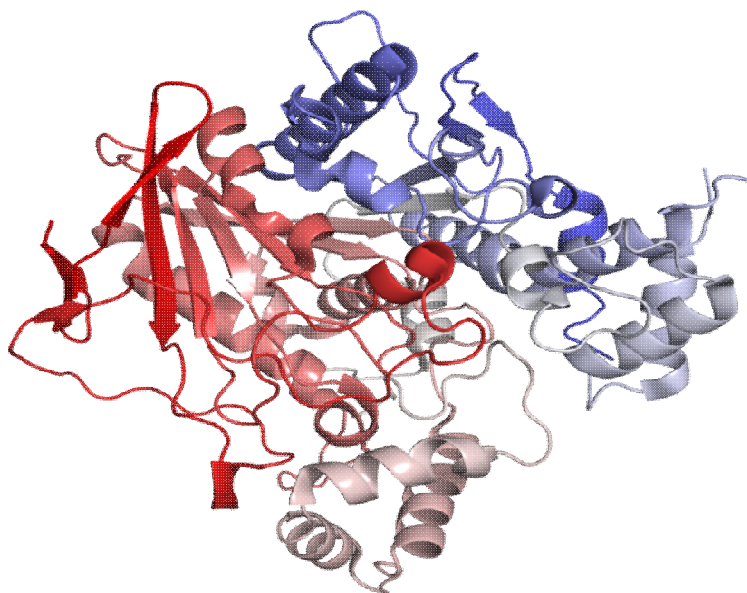
Enzym je tvořen dvěma polypeptidovými řetězci α a β , které jsou spojeny disulfidovými můstky. Primární struktura vlákna se skládá z 537 aminokyselin s Asp-1 na *N*-konci a Cys-537 na *C*-konci. Molekulová hmotnost purifikované AChE se odhaduje na 250 kDa [2]. Aktivní místo AChE je rýha hluboká asi 200 nm, jenž byla prostudována pomocí metody navázání ligandu a krystalograficky. Aktivní místo se dělí na dvě části: část katalytickou představovanou hydroxylovou skupinou serinu a periferní část s α -aniontovým místem tvořeným parciálním záporným nábojem aniontu kyseliny glutamové. Ligandy vázané na α -aniontovou část mohou vzhledem k aktivnímu centru působit jako sterické inhibitory, nebo allosterické induktory. Například vysoká koncentrace substrátu v periferní části může vést k nižší rychlosti hydrolyzy v aktivním centru [3]. Molekula AChE obsahuje ještě jedno důležité seskupení, tzv. β -aniontové. Je to akcelerační místo, neboť navázáním některých efektorů, např. vápníku, je urychlena hydrolyza ACh v synaptické štěrbině.



Obr. 2: Acetylcholinesterasa (převzáno z databáze proteinových struktur www.rcsb.org/pdb).

2.1.2 Butylcholinesterasa (BuChE)

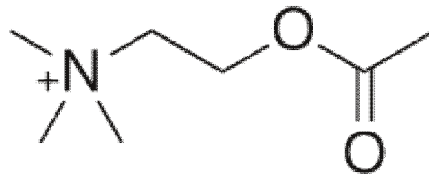
Je enzym velmi podobný AChE, shodují se v 65 % sekvence aminokyselin. BuChE ale tvoří jen jeden polypeptidický řetězec s 25 % sacharidů. Katalytické centrum je složeno (obdobně jako u AChE) z esterového a α -aniontového místa, na aktivním povrchu BuChE se však nevyskytuje β -aniontové akcelerační místo [4]. V těle se nachází především v tělních tekutinách, játrech, krevní plazmě a endotelu kapilár v mozku. Funkce BuChE byla dlouho nejasná a na rozdíl od AChE nevede pravděpodobně její inhibice k akutnímu riziku otravy. V dnešní době se jí přisuzuje úloha v cholinergní neurotransmisi, buněčné proliferaci a udržování správné funkce myelinu, růstu neuritů během vývoje nervové soustavy a taky u neurodegenerativních onemocnění [5]. Z farmakologického hlediska je důležitá při metabolismu některých léčiv (např. suxamethonia, lokálních anestetik, kyseliny acetylsalicylové), při odstraňování závislosti na kokainu, při diagnostice Alzheimerovy choroby a při odbourávání inhibitorů ChE.



Obr. 3: Butyrylcholinesterasa (převzané z databáze proteinových struktur www.rcsb.org/pdb).

2.2. Substrát – ACETYLCHOLIN (ACh)

Acetylcholin je přirozeně se vyskytující ester kvartérního amoniového alkoholu cholinu s kyselinou octovou. Zaujímá významné místo v přenosu nervového vzruchu u mnoha organismů, nejen u člověka.



Acetylcholin

2.2.1 Funkce ACh v organismu

Malé organické molekuly acetylcholinu jsou ve vysoké koncentraci shromažďovány ve vezikulách, hustě zastoupených v axoplasmě nervových pregangliových vláken obou vegetativních nervových systémů a v postgangliových zakončeních parasymptiku. Dále se uplatňuje při nervosvalovém přenosu na neuromuskulární ploténce a na čtených synapsích v mozku [6]. V těle ovlivňuje kardiovaskulární systém (snižuje srdeční frekvenci, sílu kontrakce a rozšiřuje cévy), trávicí ústrojí (zvyšuje peristaltiku žaludku a amplitudu střevních kontrakcí), močového měchýře (snižuje kapacitu a zvyšuje tlak ve stěně měchýře), a také má vliv na dýchací systém a stimulaci sekrece všech žláz. Acetylcholin je důležitý při budování dlouhodobé paměti, stejně tak i v procesu učení.

2.2.2 Syntéza a přenos v organismu

Acetylcholin vzniká spojením cholinu (dodávaného exogenně potravou) a acetylkoenzymu A (ten přenáší zbytek kyseliny octové – acetát) reakcí, kterou zprostředkovává enzym cholinacetyltransferasa (EC 2.3.6.1) nacházející se

v těle neuronu. Takto nově vytvořený ACh je do vezikulární axoplazmy transportován aktivně pomocí vezikulárního acetylcholinového transportéru (VAChT) nebo po pH gradientu vytvořeného ATP-dependentní protonovou pumpou. Vezikuly jsou prostřednictvím proteinu synapsinu zakotveny v síťovité struktuře buněčného skeletu, což umožňuje shlukování vezikul v blízkosti presynaptické membrány, zabraňuje však jejich splývání s membránou [7]. Po influxu Ca^{2+} do nitra buňky dojde ke splnutí vezikul se synaptickou štěrbinou (stimulace proteinkinasy a fosforylace synapsinu) a k difúzi ACh do synaptického prostoru [8]. ACh proniká synaptickou štěrbinou a dostává se na postsynaptickou membránu, kde reaguje s acetylcholinovým receptorem. Uvolněný ACh se rychle inaktivuje acetylcholinesterasou uloženou v bazální membráně svalových vláken nebo méně specifickou sérovou butyrylcholinesterasou v séru a intersticiální tekutině. Inaktivace tedy spočívá v rozkladu ACh na kyselinu octovou a cholin, který se díky svému kladnému náboji na dusíku vrací aktivním transportem zpět do axonu, kde se opět pomocí cholinacetyltransferasy vytvoří nový ACh.

2.3. Receptory ACh

Existují dva hlavní typy receptorů ACh (acetylcholinové receptory):

- muskarinové receptory (mAChR) jsou stimulovány, pro člověka však nefyziologicky, muskarinem pocházejícím z muchomůrky červené (*Amanita muscaria*), patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem (*G-protein-coupled receptors*). Nalézají se hlavně na membráně druhého neuronu (např. řasnaté těleso)
- nikotinové receptory (nAChR) stimuluje nikotin a ACh, mají povahu ligandem řízených receptorových kanálů (*ligand-gated receptors*) a nachází se v příčně pruhovaném svalstvu (např. okohybné svaly) [9]

2.3.1 Muskarinové receptory

Tyto receptory se nachází v efektorových orgánech inervovaných parasympatikem (cévy, srdce, žlázy a vnitřní orgány) a taky v CNS. M-receptory se dají rozdělit na 5 podtypů, z toho M₁, M₂, M₃ už mají objasněnou svou funkci. Muskarinové receptory jsou receptory spřažené s G-proteinem. Receptor je tedy peptid, který svou strukturou sedmkrát prostupuje buněčnou membránou a vytváří extracelulárně vazebné místo pro substrát. Po navázání substrátu dojde ke změně konformace receptoru v intracelulární části a umožní mu interagovat s G-proteinem [10]. G-protein je složen ze tří podjednotek, po kontaktu s intracelulární částí receptoru se největší podjednotka α oddělí. Součástí podjednotky α je guanosindifosfát, který se fosforyluje na guanosintrifosfát a spouští tak celou kaskádu reakcí s efektorovými proteiny adenylátcyklasou a fosfolipasou C. Adenylátcyklasa dále mění ATP na cAMP, ten funguje v cytosolu jako druhý posel a aktivuje např. proteinkinasu A. Ta fosforyluje další enzymy, a tím ovlivňuje jejich funkci. Fosfolipasa C odštěpuje z fosfolipidů inositoltrifosfát (IP₃), jenž funguje jako další druhý posel (reguluje tonus hladké svaloviny). Po uvolnění IP₃ z buněčné membrány zbude diacylglycerol, ten aktivuje proteinkinasu C (funguje podobně jako proteinkinasa A).

Tab 1. Podtypy muskarinových receptorů: Suhrn funkce a mechanismu podtypu muskarinových receptorů [11]

typ receptoru	lokalizace	reakce na ACh	antagonista
M ₁ -aktivace fosfolipasy C	nervové buňky, enterochromafinní buňky žaludku	aktivace	atropin, pirenzepin
M ₂ -otevření K-kanálů, inhibice adenylátcyklasy	srdce	neg. chronotropně neg. dromotropně neg. ionotropně (jen v síních)	atropin

M ₃ -aktivace fosfolipasy C	hladké svaly, žlázy	zvýšení tonu zvýšení žlázové sekrece	atropin
---	---------------------	--	---------

2.3.2 Nikotinové receptory (nAChR)

Receptory jsou umístěny především v neuromuskulární ploténce, ve vegetativním nervovém systému a v mozku. Jejich funkce udržuje vědomí, pomáhá učení, podporuje pozornost a paměť, figuruje i v řadě mozkových drah. Porušení nebo poškození těchto drah může mít na svědomí poruchy jako Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a schizofrenie. Nikotinový receptor je ligandem řízený iontový kanál v plasmatické membráně. Iontový kanál se skládá z 5 transmembránových proteinových podjednotek (pór je tedy tvořen pěti α -šroubovicemi). Záporně nabitě postranní řetězce aminokyselin zajišťují, že kanálem mohou procházet pouze ionty s kladným nábojem (Na^+ , K^+). Když se kanál nachází ve své uzavřené konformaci, je pór v zúžené části obklopen hydrofobními postranními řetězci aminokyselin. Po navázání ACh na vazebné místo, dojde ke změně na podjednotkách, a tím k otevření kationtového kanálu a prostupu kationtu po elektrochemickém spádu do buňky. Po uvolnění ACh se kanál znovu uzavře.

Tab. 2 Souhrn funkce a mechanismu podtypu nikotinových receptorů [11]

Typ receptoru	Lokalizace	Reakce na ACh	antagonista
neuronální	CNS a vegetativní ganglia	aktivace	trimetafan
muskulární	nervosvalová ploténka	depolarizace, vznik akčního potenciálu	d-tubokurarin

2.4. Pesticidy

Pesticidy jsou jednou skupinou nezbytných látek používaných v zemědělství. Mluvíme-li o pesticidech, máme na mysli širokou skupinu látek hubících škůdce [12]. Zároveň představují významný nástroj v protiepidemických opatřeních, když hmyz figuruje jako vektor. Pokud jsou látky schválené k užití Ministerstvem zemědělství na základě posudku vypracovaného odbornou komisí Ministerstva zdravotnictví, mohou být komerčně dostupné ve specializovaných částech obchodních řetězců zabývajících se ochranou rostlin před hmyzem, plevelnými rostlinami, houbami a hlodavci. V České republice je používání pesticidů regulováno §39 zákona č. 326/2004 Sb. a doprovodnou vyhláškou Státní rostlinolékařské zprávy [13]. Obecné intence jsou nařízeny Evropskou unií a to směrnicí 91/41/EHS [14]. Tyto látky jsou veřejnosti volně dostupné ve formě prášků, granulí, aerosolů a roztoků. Z důvodu možných náhodných otrav těmito látkami je velmi důležité informovat o nebezpečnosti těchto přípravků. V zemích Evropské unie a jiných vyspělých zemích je jejich použití přísně kontrolováno, ale v některých chudých afrických a asijských zemích je nekontrolované používání dodnes časté.

2.4.1 Historie organofosforových pesticidů

Poprvé byly syntetizovány v Německu, zpočátku v rámci výzkumu látek chránících plodiny před napadením škůdci, především hmyzem. Jako insekticida (látky hubící hmyz) se používají stále, proto je vhodná znalost v tomto směru i v mírové době. Brzy se však ukázala mimořádná toxicita některých derivátů pro savce, a v nacistickém Německu byl celý výzkum přísně utajen a přeorientován na výzkum bojových látek pod krycím názvem Triton. Byly to nervově paralytické látky soman, sarin a tabun. Spojencům se dostávaly jen útržky z výzkumu. Vzhledem k tomu že práce na vývoji nových bojových chemických látek probíhaly tajně, podařilo se spojencům připravit jen diisopropylfluorofosfát (DFP). S hledáním těchto otravných látek bylo

pokračováno po 2. světové válce tzv. řadou „V“ a s výzkumem zabývajícím se nervově paralytickými látkami (dnes už spíše hledáním účinné farmakoterapie otrav než vývojem nových látek) se pokračuje ve specializovaných armádních výzkumných střediscích [15]. Používání chemických zbraní a jeho následky vedly ke zvýšení aktivit na mezinárodním poli. To přispělo k jednání a dokončení textu budoucí CWC (Chemical Weapons Convention – Úmluvě o zákazu vývoje, výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a jejich zničení). V roce 1993 byla tato úmluva podepsána v Paříži a 29. dubna 1997 vešla v platnost. Současně zahájila Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW – Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons) v Haagu svou práci na kontrole ničení zásob chemických zbraní a monitorování světového chemického průmyslu, aby se zabránilo jeho zneužití v budoucnu [16].

2.4.2 Mechanismus účinku vybraných pesticidů (OFI a karbamátů)

Účinek těchto pesticidů spočívá v inhibici cholinesterasy, především AChE. OFI obsahují fosfátovou nebo fosfonátovou skupinu, která se kovalentně naváže na hydroxylovou skupinu molekuly serinu v katalytickém místě enzymu. Této reakci se říká fosforylace (případně fosfonylace) a jejím výsledkem je ireverzibilní zablokování činnosti AChE. Aktivní místo zůstává obsazené, není volné pro hydrolyzu ACh [17]. Substrát se tedy hromadí v synaptické štěrbině a dochází k nadměrnému dráždění, které má za následek zesílení cholinergních účinků (muskarinové, nikotinové a centrální, viz tab.)

Tab. 3 Cholinergní účinky [18]

Muskarinové účinky	<ul style="list-style-type: none"> - zúžení zornic - porucha akomodace - překrvení a otok ve spojivkách a nosní sliznici - zvýšené slinění, slzení a pocení - zvýšená sekrece bronchiálních žlázek, zúžení bronchů
---------------------------	---

	<ul style="list-style-type: none"> - zvýšená střevní peristaltika, bolesti až kolikovitého charakteru - bradykardie a pokles krevního tlaku
Nikotinové účinky	<ul style="list-style-type: none"> - svalová ochablost - třes a záškuby jednotlivých příčně pruhovaných svalů - záškuby se postupně rozšiřují na všechny kosterní svaly až vznikají tonicko-klonické křeče - smrtelná paralýza dýchacího svalu
Centrální účinky	<ul style="list-style-type: none"> - deprese dechového a kardiovaskulárního centra v oblasti prodloužené míchy - bolesti hlavy - úzkosti, nadměrná emoční labilita, deprese, neklidnost - závratě a zmatenost - poruchy hybnosti a možná je i ztráta vědomí - těžká dechová insuficience vede postupně k zástavě dechu s následnou zástavou srdce

2.4.3 Organofosforové pesticidy (ireverzibilní inhibitory AChE)

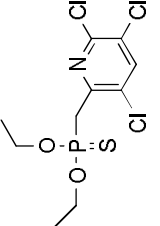
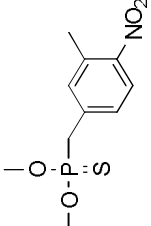
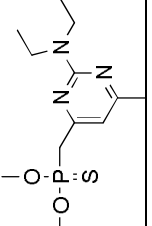
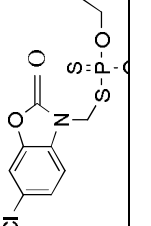
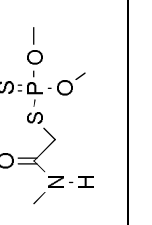
Z chemického hlediska jsou to dialkylfosfáty, dialkylfosfonáty a jejich thioanaloga. Jedná se o synteticky vyráběné deriváty kyseliny fosforečné nebo fosfonové. Rozpouští se v tučích a nepolárních rozpouštědlech, málo ve vodě. Za běžných teplot jsou to velmi těkavé kapaliny. Rozkládají se účinkem zásaditých látek (NaOH, NaHCO₃). Fyzikálně-chemické vlastnosti těchto látek se moc neliší, důležité rozdíly ale vykazují v intenzitě svého toxického působení. Jsou jedovatější než strychnin [19]. Do organismu pronikají všemi cestami, tj. požitím, vdechováním i vstřebáváním přes neporušenou pokožku a sliznice. Příznaky otravy se neobjevují bezprostředně po styku s jedem, při otravě vdechováním nastupují asi po půlhodině, po požití asi po hodině a při potřísnění kůže asi po 2 hodinách. Časy jsou pouze orientační, záleží na druhu OFI, toxicitě a vstřebeném množství.

Tab. 4 Přehled registrovaných organofosforových pesticidů v České republice:

Název	Molekulová hmotnost	LD₅₀ (mg/kg) po p.o. u krys
chlorpyrifos	350,59	135-163*
fenitrothion	277,23	500*
pirimiphos methyl	305,33	2050*
dimethoát	229,26	215-267*
Fosalon	367,81	120-180*

*Bajgar J., Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie, Avicenum 1985, str. 38-39

Tab. 5 Registrované organofosforové pesticidy

Název	Chemický	Vodní	Strukturní	Skupenství	Ekotoxicita
chlorpyrifos (kontaktní insekticid + akardicid)	<i>O,O</i> -diethyl 3,5,6-trichlor-2-pyridyl fosforothioát	Dursban; Lorsban; Dowco; Pyninex; ENT 27311; OMS 971; Aliekol; Dursban 10 G;		Bílá krystalická látka se slabým merkaptovým zápachem	Oplach z polí kontaminuje plody, zbytky se vyskytují v textilních rostlinách a následně v produktech
fenitrothion (konec používání do 25.11.2008, respirační a kontaktní jed +selektivní akardicid, účinný v boji proti malárii)	dimethoxy-(3-methyl-4-nitrofenoxy)-thioxofofosforan	Sumithion Super		Žlutohnědá transparentní kapalina se slabým zápachem	Rychle se rozpadá, je jedovatý pro včely
pirimiphos methyl (dotykový a požerový jed, asanace sil a skladů)	<i>O</i> -[2-(diethylamino)-6-methylpyrimidin-4-yl] <i>O,O</i> -dimethyl	Actellic 50EC		Světle hnědá kapalina se silným aromatickým, dráždivým	Vodní organismus, má vysoký potenciál pro kumulaci
fosalon (kontaktní a požerový jed s hlubokým účinkem)	6-chlor-3-(diethoxyfosfinitioylsulfanyl)methyl-1,3-benzoxazol-2-on	Zolone 35EC		Červená kapalina s aromatickým zápachem	Ryby, vodní rostliny, bezobratlé, ptáci a vysoce toxické pro hmyz
dimethoát (kontaktní a požerový jed)	<i>O,O</i> -dimethyl <i>S</i> -[2-(methylamino)-2-oxoethyl] dithiofosfát	Perfekthion, Bi-58 EC		Modrá tekutina s odporným zápachem	Rychlá degradace v půdě, toxické pro ptáky, bezobratlé a vodní živočichy

2.4.4 Karbamáty (reverzibilní inhibitory AChE)

Tyto látky patří mezi estery kyselin alkyلكarbamových s bazickými fenoly. Nejdéle používaným karbamátovým inhibitorem AChE je alkaloid fysostigmin z rostliny *Physostigma venenosum* a jeho syntetická obdoba neostigmin. Karbamáty jsou dobře absorbovány plícemi, GIT i kůží [20]. Příznaky akutní otravy jsou podobné jako u OFI, jejich účinek je díky jejich labilitě krátkodobější [21]. Rozkládají se stejně jako OFI za použití zásaditých látek (sody a louhu). Některé karbamáty se využívají jako prevence před otravou OFI. Aktivní centrum cholinesteras je tak chráněno před ireverzibilními OFI, které se zatím v organismu detoxikují, aniž by způsobily intoxikaci [22].

Tab. 6 Registrované karbamáty

Název	Molekulová hmotnost	LD ₅₀ po p.o. (mg/kg)	Chemický název
pirimikarb	238,29	150	(2-dimethylamino-5,6-dimethylpyrimidin-4-yl)- <i>N,N</i> -dimethyl karbamát
karbofuran (po 13.12.2008 nelze používat)	221,25	8-14	2,2-dimethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl- methyl karbamát
karbosulfan (po 13.12.2008 nelze používat)	380,54	250	
methiokarb	225,31	20	3,5-dimethyl-4-(methylthio)fenyl-methyl karbamát
fenoxykarb	301,34	10000	ethyl <i>N</i> -[2-(4-fenoxyfenoxy)ethyl] karbamát

2.5. Akutní otrava organofosforovými pesticidy

Pesticidy jsou na našem trhu volně dostupné v řadě obchodních řetězců, a proto při nedostatečné ochraně pracovníků, špatné manipulaci anebo také kontaminací potravin může dojít k akutní otravě. Na otravy vyvolané pesticidy připadají celosvětově přibližně 4 % ze všech možných otrav, a je odhadováno, že 15 pacientů ročně své otravě podlehnou (to je asi 0,02 % všech hlášených otrav způsobených pesticidy) [23].

Akutní otrava pesticidy se projevuje důsledkem blokády AChE. Je tedy způsobena sníženou degradací ACh v synaptické štěrbině a jeho silnějším působením na muskarinové a nikotinové receptory. Stimulace těchto receptorů se projevuje cholinergními účinky uvedenými v tab. 3.

Někdy však nebývají příznaky zcela odpovídající otravě OFI, nebo není intoxikace rozpoznána vůbec. V mnohých případech dochází k pozdějšímu projevu intoxikace, tzv. pozdnímu neurotoxickému efektu. Tento efekt je charakterizován pohybovými a rozpoznávacími poruchami projevujícími se za delší dobu (v rádech týdnů) po expozici. Po bezpříznakové latenci se objevují částečnou anamnézou akutní otravy. Charakteristické jsou bolesti až křeče v lýtkách, následuje zhoršení šířící se od prstů nohou do středu těla, horní končetiny jsou postiženy během 1 až 2 týdnů. Výsledným stavem je těžká atrofie svalů nohou i rukou trvající 2 – 6 měsíců [24]. Období rekonvalescence bývá velmi dlouhé, ještě po několika letech je možno se setkat se zvýšeným napětím a abnormálními reflexy ve svalech.

2.6. Chronická otrava OFI

Může se objevit po opakované expozici nízkým dávkám OFI v dlouhém časovém úseku. AChE se tedy inhibuje postupně a receptory se stávají citlivější na vyšší hladinu ACh. Takto senzibilizovaný jedinec může zemřít i po styku s velmi malým množstvím OFI, které by jinak zdravému člověku neublížilo.

Období chronické intoxikace může být bezpříznakové anebo se objevují příznaky v podobě nespavosti, emoční lability, zvýšené únavnosti apod. Při podezření je nezbytné provést laboratorní testy a zahájit včasnou terapii.

2.7. Profylaxe

Akutní otravě OFI je nutné předcházet, a to pomocí ochranných pomůcek (oděv, gumové rukavice, plynová maska), potřísněnou kůži dekontaminovat přípravkem Desprach, nebo provést aktivní profylaktickou terapii. V dnešní době známe tři různé cesty terapie, které připadají v úvahu:

1. Použití pyridostigminu jako profylaktického antidota. Podání vyšší dávky znamená vyšší profylaktickou účinnost, ale také silnější vedlejší účinky. Tato možnost byla zavedena jako účinná profylaxe v armádách. Výskyt vyšších nežádoucích účinků se dá úspěšně eliminovat přidáním dvou anticholinergik s převahou centrálního účinku (benaktyzin a trihexyfenidyl). Doporučené dávkování je tableta A (35 mg pyridostigminu) a tableta B (benaktyzin 8 mg, trihexyfenidyl 6 mg v tabletě s řízeným uvolňováním) po 8 hodinách [25].

2. Druhým způsobem je nová léčba v předstihu. To znamená podávání běžně používaných antidot, ale je třeba mít v krvi vysokou a hladinu těchto léčiv přetrvávající po delší dobu. Do AČR byla tato léčba uvedena ve dvou přípravcích PANPAL (autoinjektor) a TRANSANT (náplast dodávající účinnou látku transdermálně). Oba tyto preparáty obsahují reaktivátor inhibované AChE asoxim (HI 6). Kombinace těchto dvou přípravků patří k vysoce účinné farmakologické profylaxi před intoxikací OFI.

3. Poslední možností je vychytávání NPL (OFI) v krvi, ještě před dosažením cílového a vazebného místa, realizované podáním látek s vysokou afinitou k NPL, tj. preparátů cholinesteras a jiných enzymů (tzv. scavengerů) [26]. Tato možnost je zkoumána v USA a podílí se i Česká republika.

2.8. Terapie

Reakci organismu na otravu OFI lze jen těžko odhadovat, proto se doporučuje jakkoliv vážně intoxikovaného jedince hospitalizovat na příslušném nemocničním oddělení a pacienta 24 hodin monitorovat. Začíná se zjištěním stavu otráveného a následně se zajišťují jeho základní životní funkce jako je dýchání a fungování kardiovaskulárního systému. Po těchto opatřeních by se mělo přejít k dekontaminaci postiženého:

- Kůže
 - nejprve musí dojít k odstranění potřísněného oděvu, otřít kůži 5 – 10% roztokem hydrogenuhličitanu sodného a pak místo umýt mýdlem a vodou (OFI podléhají hydrolýze), případně provést vyvázání OFI do matrice sorbentu jakým je například výše zmíněný Desprach
 - ošetřující pracuje zásadně v gumových rukavicích, popř. i gumové zástěře
- Oko
 - přes oko OFI výborně přestupují do organismu, proto je třeba, co nejrychleji po vniknutí vypláchnout oko 3% roztokem uhličitanu, vodou, nebo fyziologickým roztokem (a to několikrát za sebou) a vkápnout 1% roztok atropinu [27]
 - při bolestivé otravě se může vkapávat i mesokain, a to do vymizení bolesti
- GIT
 - při požití OFI co nejrychleji přinutit postiženého ke zvracení (do 30 minut), pak provést laváž žaludku roztokem hydrogenuhličitanu sodného
 - podávání aktivního uhlí je vhodné i několik dní po otravě

2.9. Antidota

2.9.1 Atropin

Atropin funguje jako kompetitivní antagonist ACh. Je dostatečně distribuován přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Blokuje pouze muskarinové receptory. Neovlivňuje tedy slabost nebo křečovitě záchvaty kosterního svalstva. Tyto symptomy je nutné zvládnout např. diazepamem.

Účinky atropinu jsou bronchodilatace, snížení bronchiální sekrece, zvýšení srdeční frekvence a AV přenosu, sucho v ústech, zvýšený výdej tepla zapříčiněný zvýšeným prokrvením pokožky (suchá kůže), snížená peristaltika a tvorba trávicích šťáv.

Dávkování atropinu u otrav OFI vždycky vychází ze závažnosti stavu pacienta, u dospělých je indikována dávka 2 – 5 mg i. v. a u dětí je to 0,02 – 0,1 mg/kg i.v., ale maximálně 2 mg. Další dávky lze indikovat s přihlédnutím k aktuálnímu stavu, u dospělých je to 1 – 4mg i.v. a u dětí 0,015 – 0,05 mg/kg i.v. Tyto dávky se opakují podle odpovědi na terapii každých 20 minut, a pokud se nedostavuje efekt, dávka se zdvojnásobí. Indikátorem pro určení velikosti a častosti dávky je suchost sliznic, ústup bronchiální sekrece a pocení.

Při náhodném předávkování atropinu se podává fyzostigmin-salicylát.

2.9.2 Oximy

Tyto sloučeniny lze strukturně charakterizovat jako mono- či biskvakvartérní symetrické či asymetrické pyridinové deriváty s nukleofilní oximovou (hydroxyiminomethylovou) skupinou [28]. Oximy jsou různě účinné reaktivátory AChE. To znamená, že jsou to chemická individua schopná uvolňovat OFI z vazby na AChE, a tím se obnovuje její činnost. Prvním klinicky zkoušeným oximem byl pralidoxim, který se ukázal jako účinný především u pacientů s otravou parathionem. Pralidoxim existuje ve formě solí (jodid, chlorid, methylsulfát a methylsulfonát). Nejširší použití mají chlorid a

jodid pralidoximu [29]. Žádný z dosud známých reaktivátorů však není schopen reaktivovat všechny OFI, a proto v tomto směru stále probíhá snaha vytvořit vysoce účinný širokospektrý reaktivátor.

K nejčastěji používaným reaktivátorům AChE lze zařadit:

- **pralidoxim** (2-PAM, 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium-chlorid)
- **trimedoxim** (TMB-4, 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)propandibromid)
- **obidoxim** (Toxogonin®), 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropan-dibromid)
- **asoxim** (HI-6, 1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxapropan-dichlorid)
- **methoxim** (MMC, bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)methan-dibromid)

Terapie oximy vyžaduje kombinaci s atropinem, který působí synergicky. Délka terapie se odhaduje na nejméně 24 – 48 hodin. U OFI se silnou afinitou k lipofilní fázi se reaktivátory podávají i několik dní. Dávkování oximů se určuje podle příbalové informace jednotlivých výrobců. Obvyklá dávka pralidoxim-chloridu je 30 mg/kg i. v. nebo 8 mg/kg/hod při podávání infúzí.

2.9.3 Sérová cholinesterasa (přesněji pseudocholinesterasa, EC 3.1.1.8.)

Jedná se pouze o podpůrnou terapii při otravě OFI. Enzym je produkován játry, volně přestupuje do krve, odkud se následně získává. Aktivita substance používané v terapii otrav by měla odpovídat aktivitě ChE, která je měřitelná v 500 ml čerstvé normální lidské plazmy, proto se musí volit individuální dávkování pro každého pacienta. Většinou se v terapii pokračuje až do stanovení normální aktivity AChE v krvi pacienta [30].

Experimentální část

3. Experimentální část

3.1. Seznam chemikálií

Elmannovo činidlo (DTBN – 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) od firmy Sigma-Aldrich, Inc.

Acetylcholinesterasa (AChE) z lidských erytrocytů (Sigma-Aldrich, Inc.)

Acetylthiocholin chlorid (ACTChCl) 0,01M ve fosfátovém pufru

Fosfátový pufr 0,01M pH 7,4

Isopropylalkohol (Sigma-Aldrich, Inc.)

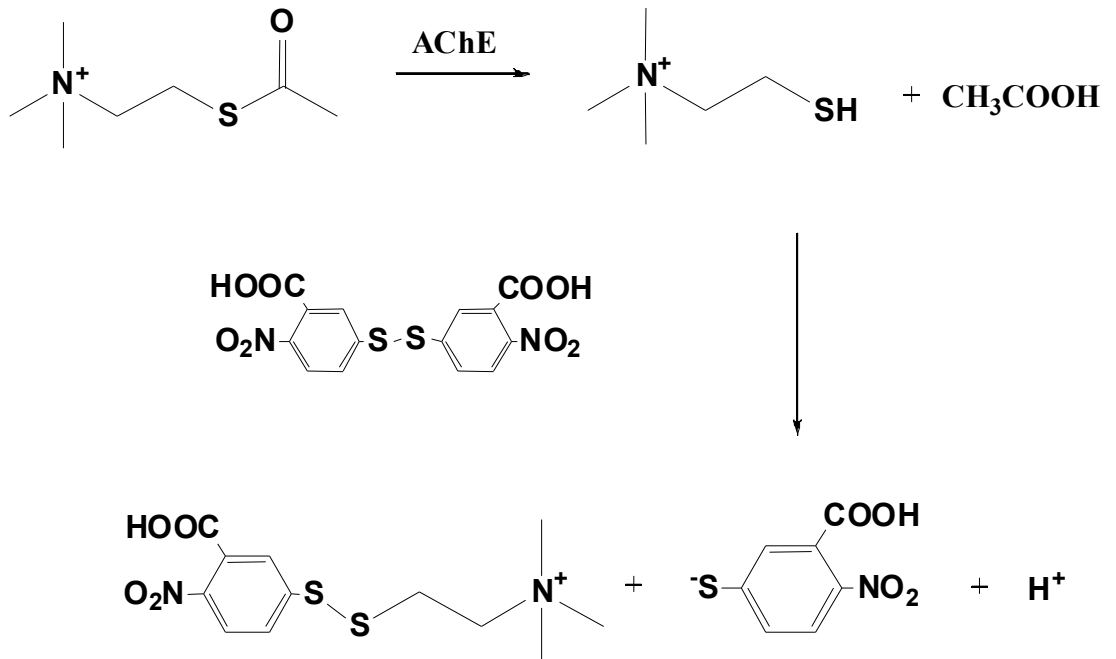
Pro řešení experimentu byly použity následující pesticidy od výrobce Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany):

- paraoxon methyl
- paraoxon ethyl
- DFP
- dichlorvos
- dimethoát
- fosalon
- chlorpyrifos
- chlorpyrifos methyl
- fenitrothion

3.2. Metodika průběhu stanovení reaktivace

3.2.1. Ellmanova metoda

Pro biochemické sledování aktivity AChE byla použita Ellmanova metoda. Mechanismus reakce je tento: substrát acetylthiocholin je hydrolyzován na octovou kyselinu a thiocholin. Thiocholin reaguje s 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoovou) kyselinou (dále DTNB) za vzniku 2-nitro-5-sulfanylbenzoové kyseliny. Reakce se projevuje vznikem žlutého zbarvení spektrofotometricky měřitelného při 412 nm bez jakékoliv další časové prodlevy nebo dalších fyzikálních zásahů. Tato reakce je blokována v přítomnosti nervově paralytické látky inhibicí acetylcholinesterasy. Princip metody je znázorněn na následujícím schématu:



3.2.1 Chemikálie a vybavení

Enzym AChE z lidských erytrocytů, acetylthiocholin-chlorid (ATChCl), Ellmanovo činidlo, případně látka modulující aktivitu AChE (inhibitor). Roztoky byly připravovány ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (PBS), nebo deionizované vodě, je-li to uvedeno. Aktivita enzymu je upravena na 5×10^{-8} kat/ μ l.

Pro měření byly použity 96-jamkové titrační destičky z PS a s rovným dnem. Měření bylo prováděno na spektrofotometru nebo multikanálové čtečce 96-jamkových destiček s nastavenou vlnovou délkou na 412 nm.

3.2.1.1 Charakterizace ELISA readeru

K měření absorbance byl použit TECAN Sunrise Absorbance Reader , jehož výrobcem je Tecan Austria GmbH (Grödig/Salzburg, Austria).

Byly použity mikrotitrační destičky dělené, Polysorp Elisa 96 well plate od firmy GAMA GROUP a.s. (Trhové Sviny, Česká republika).



Obr. 4: ELISA reader.

3.2.2 Schéma měření

Do jedné jamky bylo postupně přidáno:

- 20 μ l DTNB – 4 mg/ml
- 15 μ l roztoku AChE
- 5 μ l testovaného roztoku inhibitoru (koncentrace odpovídající 95% inhibici)
- 10 μ l roztoku reaktivátoru, nebo PBS (kontrola)
- 30 μ l PBS
- Reakce byla spuštěna přidáním 20 μ l 10 mM ATChCl
- Celková doba měření jednoho vzorku byla 20 minut, každý vzorek byl měřen třikrát pro účely statistického zpracování

Pro odhad oximolýzy byl použit roztok obsahující vše jak výše uvedeno se záměnou roztoku AChE za PBS.

Byla změřena prvotní absorbance a pak absorbance po 1 minutě. Rozdíl absorbancí byl úměrný enzymové aktivitě. Pokud byla aktivita nízká, byl čas odečtu prodloužen.

3.2.3 Výpočet reaktivace

Procento reaktivace bylo vypočteno dle následujícího vzorce:

$$R(\%) = \frac{A_r - A_{ox}}{A_0 - A_i} \times 100$$

Kde A_r je absorbance po reaktivaci, A_{ox} je absorbance vzniklá díky oximolýze, A_0 je absorbance vyvolaná intaktním enzymem a A_i je absorbance vyvolaná inhibovaným enzymem.

3.3. Výsledky experimentální části

3.3.1 Inhibice vlivem rozpouštědla

Používané pesticidy se špatně rozpouští a mají krátkou trvanlivost ve vodě a čistých pufrech, proto bylo nutné vybrat vhodné rozpouštědlo pro uchovávání testovaných pesticidů. Rozpouštědlo musí mít dobrou kompatibilitu s vybranými OF pesticidy a zároveň by mělo minimálně zmenšovat aktivitu AChE užitou v experimentu. Inhibice se proměřovala u acetonitrilu, propan-2-olu, DMF, THF, propan-1-olu, n-butanolu a pentanolu, a to v koncentracích (v/v) 20, 10 a 5 %. Tyto koncentrace jsou snadno dosažitelné v reakční cele (resp. titračních jamkách) ředěním zásobního roztoku pesticidu. Pro toto upotřebení byl stanoven jako nejvhodnější propan-2-ol v 5% koncentraci (tab. 7).

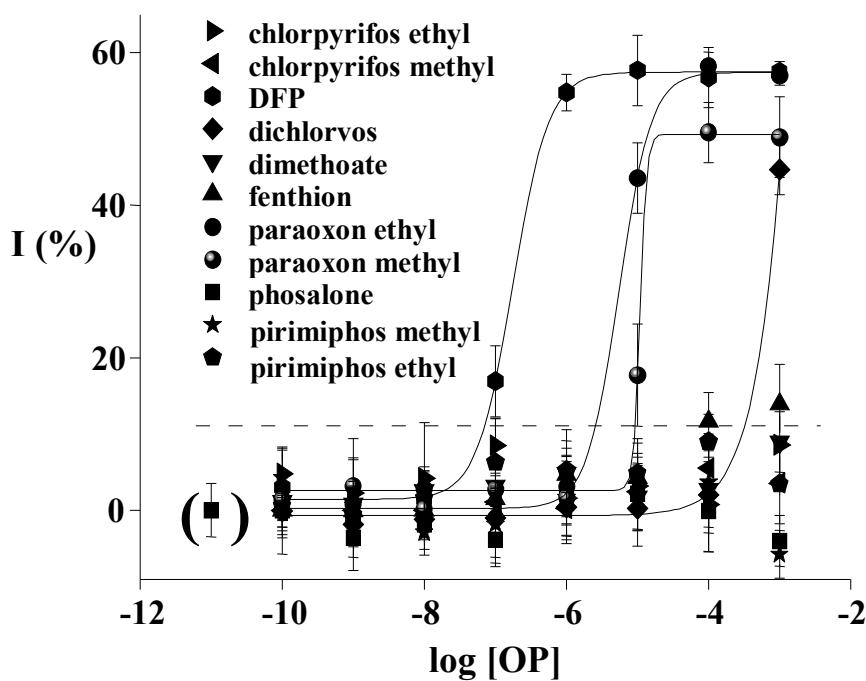
Tab. 7 Schopnost rozpouštědel snižovat aktivitu AChE, číslo udává procento inhibice AChE z lidských erytrocytů.

	20%	10%	5%
acetonitril	79,3	56,5	37,4
propan-2-ol	74,6	58,2	24,3
DMF	80,4	77,4	62,2
THF	72,2	67,9	48,2
propan-1-ol	76,9	69,8	40,7
n-butanol	75,3	78,5	60,9
pentanol	57,2	63,4	64,0

3.3.2 Výběr OF inhibitorů AChE

Pro testování bylo vybráno jedenáct pesticidů v p.a. kvalitě. Pro účely testování účinnosti oximových reaktivátorů byly vybrány pesticidy na základě schopnosti inhibovat AChE. Proměřovány byly jednotlivé řady pesticidů v koncentračním rozmezí od 4×10^{-3} až po 4×10^{-10} M s přidávkem

isopropylalkoholu 5% (v/v). Po 20 minutách inhibice byla reakce spuštěna přidáním ATChCl a změřena absorbance jednotlivých jamek. V rámci regrese byly rozpoznány čtyři pesticidy, které signifikantně inhibovaly AChE (Obr. č. 5). Pro samotný experiment byly použity jen tři z nich: paraoxon methyl, paraoxon ethyl a DFP. Dichlorvos inhiboval AChE jen ve velmi vysokých koncentracích a tato inhibice mohla být založena na nespécifickém poškození molekuly AChE. Ostatní pesticidy jsou typické inhibitory AChE po metabolické aktivaci a tento proces nebylo možno navodit *in vitro* používanými technikami.



Obr. 5: Stanovení schopnosti pesticidů inhibovat AChE (závislost koncentrace pesticidu na inhibici).

3.3.3 Reaktivace inhibované AChE paraoxon methylem, paraoxon ethylem a DFP

Tab. 8. Schopnost reaktivace *in vitro* inhibované AChE vybranými organofosforovými pesticidy (DPF, paraoxon methyl, paraoxon ethyl). V tabulce jsou udané hodnoty reaktivace pro dvě stanovované koncentrace reaktivátoru (4×10^{-4} a 4×10^{-6} M).

Reati- vátor	R(%) ^{↑c} DFP	R(%) ^{↓c} DFP	R(%) ^{↑c} PM	R(%) ^{↓c} PM	R(%) ^{↑c} PE	R(%) ^{↓c} PE
K005	37,2	8,6	55,4	2,9	36,6	4,3
K006	56,1	13,0	35,8	8,5	21,2	6,3
K011	69,7	11,4	39,0	0,0	4,9	0,0
K018	42,3	26,6	63,1	10,3	88,2	8,4
K027	50,9	9,7	45,5	5,4	24,2	2,6
K033	35,5	5,8	63,2	10,2	17,5	5,9
K048	45,0	17,9	17,6	0,0	15,6	8,0
K053	64,8	4,8	0,6	0,0	68,9	0,0
K064	61,6	12,5	63,5	1,8	49,1	0,0
K071	16,6	1,4	44,5	1,3	8,7	0,0
K075	40,9	9,3	36,2	2,3	29,0	5,4
K088	18,7	4,1	18,7	4,2	83,6	0,0
K100	36,6	13,9	37,5	3,0	24,6	7,5
K104	33,7	10,9	21,8	7,6	18,6	4,5
K107	52,7	35,4	10,9	1,5	28,7	0,0
K108	57,9	28,0	97,4	11,4	28,9	10,6
K116	21,2	9,1	59,3	1,6	20,8	11,5
K117	23,4	5,7	15,3	5,2	1,3	6,2
K120	38,2	11,3	11,8	0,8	24,2	7,4
K121	29,2	10,7	9,2	1,0	16,3	5,8
K127	27,2	14,3	16,3	2,8	25,3	5,9
K129	67,9	32,4	71,0	5,2	42,9	7,7
K131	26,3	6,0	31,8	2,2	37,4	9,5

K142	25,6	10,8	40,5	4,8	24,4	7,0
K169	30,6	13,7	9,0	2,2	66,7	3,2
K180	48,9	16,9	41,8	0,0	58,0	0,0
K183	58,1	23,4	31,0	7,3	39,1	7,0
K184	83,4	15,1	52,9	35,4	19,7	7,0
K185	66,2	9,0	22,2	7,2	56,4	3,0
K186	24,5	12,2	43,2	7,1	29,3	3,5
K187	40,0	9,0	31,8	0,0	32,2	6,8
K188	46,3	6,0	36,5	3,7	41,6	3,4
K191	40,9	14,5	36,5	0,2	46,2	3,6
K197	43,0	13,4	23,7	2,8	56,7	4,4
K201						
(BI-6)	63,5	4,8	58,5	9,7	60,2	14,3
K202	15,4	1,2	16,6	6,9	39,8	2,5
K203	39,4	1,4	33,9	4,8	28,5	2,3
K204	50,3	13,7	34,8	1,4	47,1	5,2
K205	42,6	7,8	16,7	0,0	25,9	4,5
K207	39,1	10,7	15,4	0,0	34,4	7,8
K208	61,2	18,3	52,3	8,8	48,4	1,6
K209	50,0	5,2	0,0	0,0	14,4	4,6
K226	53,9	26,5	23,8	5,7	24,1	11,8
K245	29,7	10,6	55,7	4,2	52,1	10,3
K246	81,3	21,6	83,6	8,9	96,8	3,6
K250	23,1	10,8	33,5	7,3	18,8	2,9
K251	35,4	14,2	36,2	3,7	54,3	4,7
K252	41,9	13,1	50,9	11,6	41,9	5,9
K253	33,9	10,9	30,5	4,6	44,0	4,7
K254	49,0	11,3	10,6	5,8	50,9	6,6
K255	41,6	10,5	40,8	9,7	35,4	4,4
K256	16,5	14,0	42,8	2,5	57,1	6,5
K257	37,0	6,5	3,7	2,5	5,7	2,4
K258	73,1	10,5	24,9	2,9	44,0	2,8
K260	24,8	10,1	0,0	0,0	18,2	3,5
K262	46,3	11,0	37,5	2,1	48,7	4,8
K263	59,5	30,6	62,8	19,9	31,1	4,4

K265	98,0	61,0	66,1	13,5	30,3	4,4
K281	52,8	17,3	29,5	2,7	69,1	10,2
K283	29,1	3,2	68,3	2,2	20,6	19,2
K284	40,1	4,4	54,8	5,5	24,4	4,7
K285	89,5	22,9	43,7	4,5	38,8	17,7
K289	98,8	13,7	71,1	7,4	66,5	5,9
K309	32,2	14,9	30,4	1,6	68,9	7,7
K318	39,9	20,2	38,8	0,0	83,1	22,7
K335	49,7	41,8	57,6	0,0	43,7	0,0
K336	84,6	43,2	10,4	0,0	5,0	0,0
K348	88,2	43,4	2,7	0,0	12,1	0,0
K349	86,2	39,3	5,6	0,0	3,1	0,0
K370	95,1	42,3	27,5	0,0	19,1	0,0
K372	81,2	41,1	12,6	0,0	39,4	0,0
K374	72,3	45,4	99,8	0,0	29,8	0,0
K380	9,3	0,0	33,9	5,5	34,9	9,9
K381	31,7	0,0	55,9	7,6	29,7	14,9
K382	3,5	0,0	13,2	2,7	38,5	21,3
K385	80,6	16,8	52,7	14,9	46,7	16,4
K386	12,7	0,0	55,1	19,4	31,0	36,7

Vysvětlivky: R(%).....procento reaktivace vypočítané podle vzorce (viz výše)

↓c.....nižší koncentrace použitého reaktivátoru $4 \times 10^{-4} \text{M}$

↑c.....vyšší koncentrace použitého reaktivátoru $4 \times 10^{-6} \text{M}$

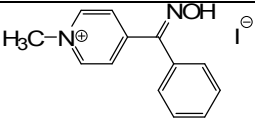
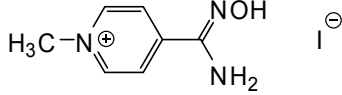
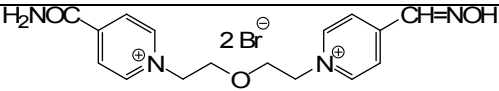
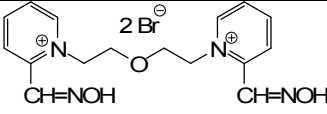
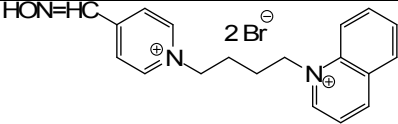
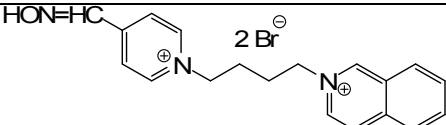
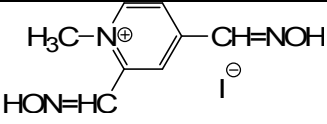
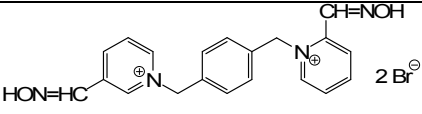
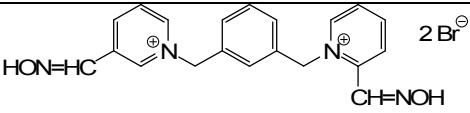
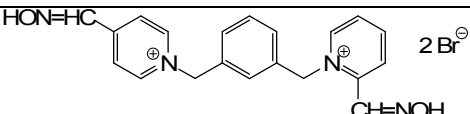
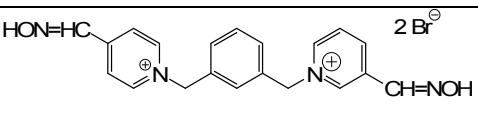
DFP (diisopropylfluorofosfát), PM (paraoxon methyl), PE (paraoxon ethyl)

3.4. Strukturní vzorce použitých reaktivátorů

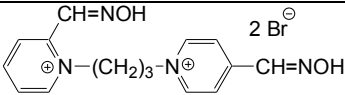
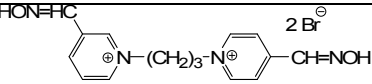
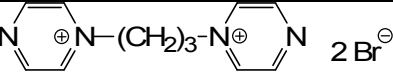
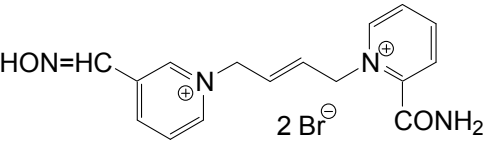
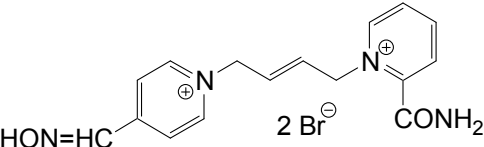
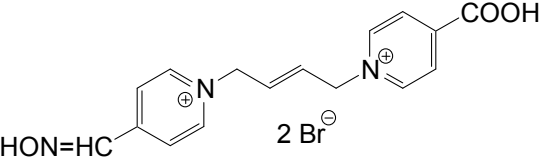
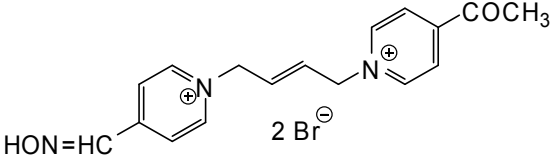
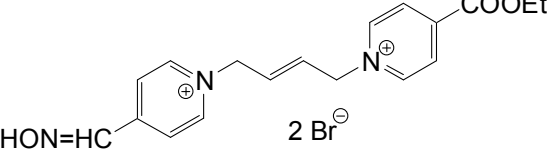
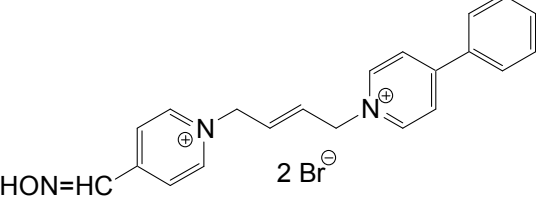
Tab. 9 Udává pojmenování, strukturní vzorec a molekulovou hmotnost používaných reaktivátorů v experimentální části.

Reaktivátor	Struktura	Molekulová hmotnost
K005		446.14
K006		324.01
K011		428.12
K018		446.14
K027		446.14
K033		460.16
K048		460.16
K053		456.15

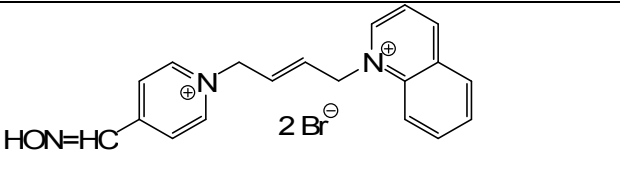
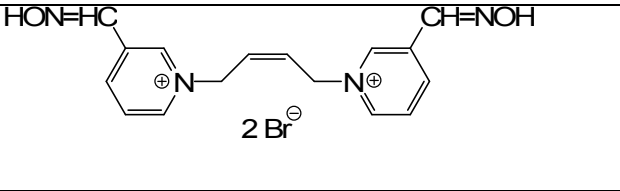
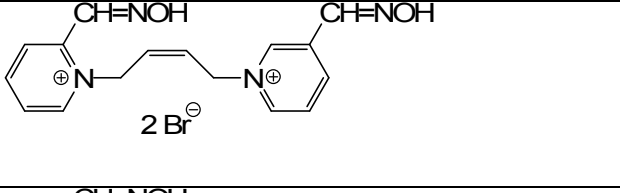
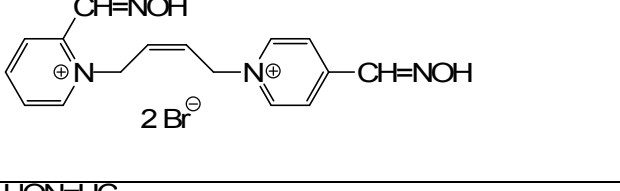
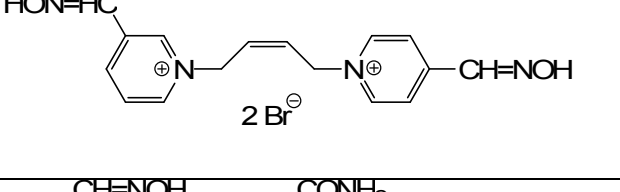
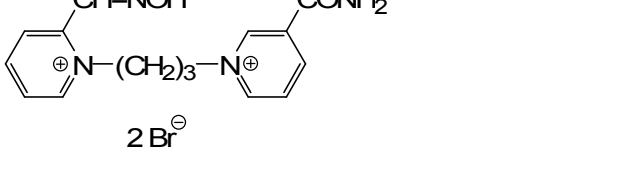
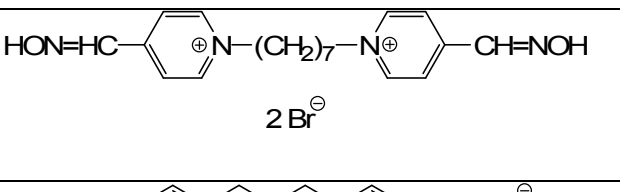
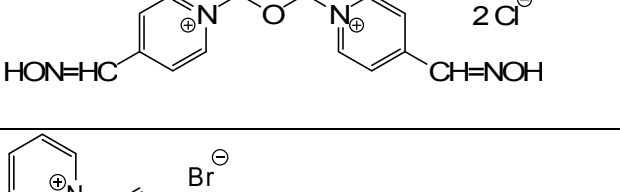

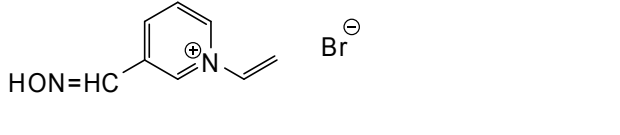
K064		415.12
K071		471.23
K075		458.15
K088		341.15
K100		264.06
K104		458.15
K107		508.21
K108		508.21
K116		476.16
K117		476.16

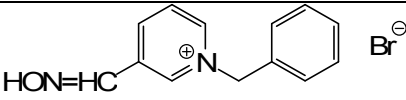
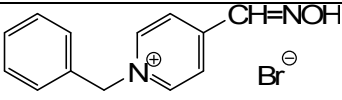
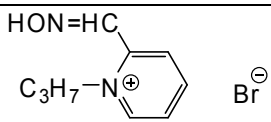
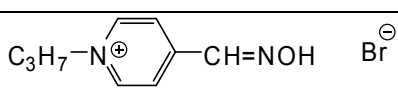
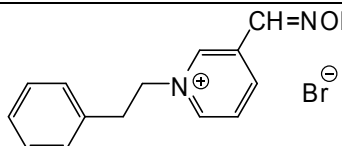
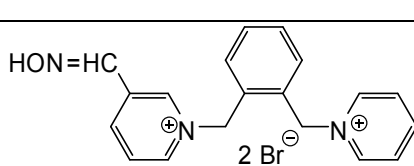
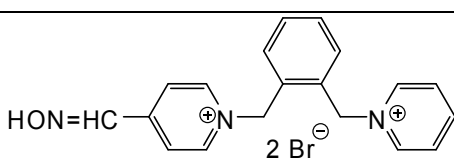
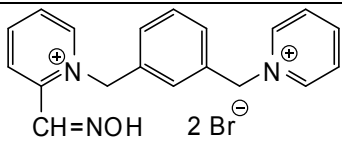
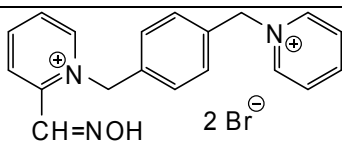
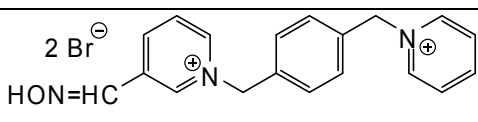
K120		340.16
K121		279.08
K127		476.16
K129		476.16
K131		467.20
K142		467.20
K169		307.09
K180		508.21
K183		508.21
K184		508.21
K185		508.21

K186		508.21
K187		508.21
K188		508.21
K191		432.11
K197		516.27
K201		458.15
K202		458.15
K203		458.15
K204		458.15
K205		458.15
K207		446.14

K208		446,14
K209		446,14
K226		362,06
K245		458,15
K246		458,15
K250		459,13
K251		473,16
K252		487,19
K253		491,22

K254	<p>HON=HC 2 Br^{\ominus}</p>	505,23
K255	<p>HON=HC 2 Br^{\ominus}</p>	415,22
K256	<p>HON=HC 2 Br^{\ominus}</p>	440,13
K257	<p>HON=HC 2 Br^{\ominus}</p>	431,12
K258	<p>HON=HC 2 Br^{\ominus}</p>	445,15
K260	<p>HON=HC 2 Br^{\ominus}</p>	523,24
K262	<p>HON=HC 2 Br^{\ominus}</p>	429,15
K263	<p>HON=HC 2 Br^{\ominus}</p>	471,23

K265		465,18
K281		458,15
K283		458,15
K284		458,15
K285		458,15
K289		446,14
K309		502,24
K318		359,21
K335		243,10
K336		243,10

K348		293,16
K349		293,16
K370		245,12
K372		245,12
K374		307,19
K380		465,18
K381		465,18
K382		465,18
K385		465,18
K386		465,18

4. Diskuze

Cílem této práce bylo *in vitro* testování schopnosti řady reaktivátorů syntetizovaných na Katedře toxikologie FVZ UO reaktivovat AChE inhibovanou OF pesticidy a následné doporučení perspektivních sloučenin k testování *in vivo*.

Před vlastním začátkem experimentálního ověření reaktivační účinnosti bylo nutné vybrat vhodné chemikálie k rozpuštění inhibitorů a samotný inhibitor k tomu, aby podmínky pro reaktivaci byly co nejvhodnější. Nejprve jsem musela vybrat a charakterizovat vliv rozpouštědla na AchE. Vlastním významem rozpouštědla bylo rozpouštění a uchovávání organofosforového pesticidu. Zkoušená rozpouštědla byla vybírána na základě předchozích zkušeností a ve shodě s nalezenou odbornou literaturou, tak aby byla kompatibilní s organofosforovými sloučeninami a zároveň AChE: acetonitril, propan-2-ol, DMF, THF, propan-1-ol, n-butanol a pentanol (v koncentracích (v/v) 20, 10 a 5 %). Koncentrace 5 % (v/v) se u všech měřených rozpouštědel ukázala jako nejvhodnější, ale pouze propan-2-ol v nejmenší míře ovlivňoval aktivitu enzymu, a proto byl v experimentu použit jako rozpouštědlo pesticidů. Toto rozpouštědlo bylo již dříve vybráno k toxikologickému sledování OFI v *in vivo* experimentech.

Dalším krokem byl výběr pesticidu, který inhibuje AChE bez předchozí metabolické aktivace. Při výběru pesticidů byl zároveň zohledněn praktický význam ve smyslu, že pesticid je komerčně používán buď v rámci České republiky, nebo v jiných světových lokalitách. Pro stanovení pesticidu, který nejlépe inhibuje enzym v koncentraci použitelné pro další *in vivo* zkoušení, byla využita kalibrace vzhledem ke koncentraci daného pesticidu. Jak je možné vyčíst z obrázku číslo 6., pro testování účinnosti reaktivace byly vybrány následující pesticidy: paraoxon methyl, paraoxon ethyl a DFP. Podle experimentálních dat se jeví jako částečně účinný inhibitor bez metabolické aktivace dichlorvos. To může být ale způsobeno nespecifickou reakcí vzhledem

k vysoké koncentraci. Z tohoto důvodu nebyl dichlorvos zařazen do dalšího testování.

Pro vlastní sledování reaktivační účinnosti bylo vybráno 110 oximových reaktivátorů připravených na Katedře toxikologie. Z tohoto počtu bylo na základě níže zmíněných důvodů vyřazeno 32. Ke sledování reaktivační účinnosti na multikanálovém spektrofotometru použito 78 reaktivátorů.

Nejmarkantnějším problémem byla nízká rozpustnost některých testovaných reaktivátorů. Zejména se jen velmi špatně rozpouštěly (K065, K066, K067, K089, K182, K261). U některých reaktivátorů užitých v experimentu byl problémem vznik barevného komplexu v přítomnosti (K064, K266, K376, K377) spojený se vznikem sraženiny. Z výše uvedených důvodů jsem se rozhodla sloučeniny nepoužít pro další charakterizaci reaktivační účinnosti.

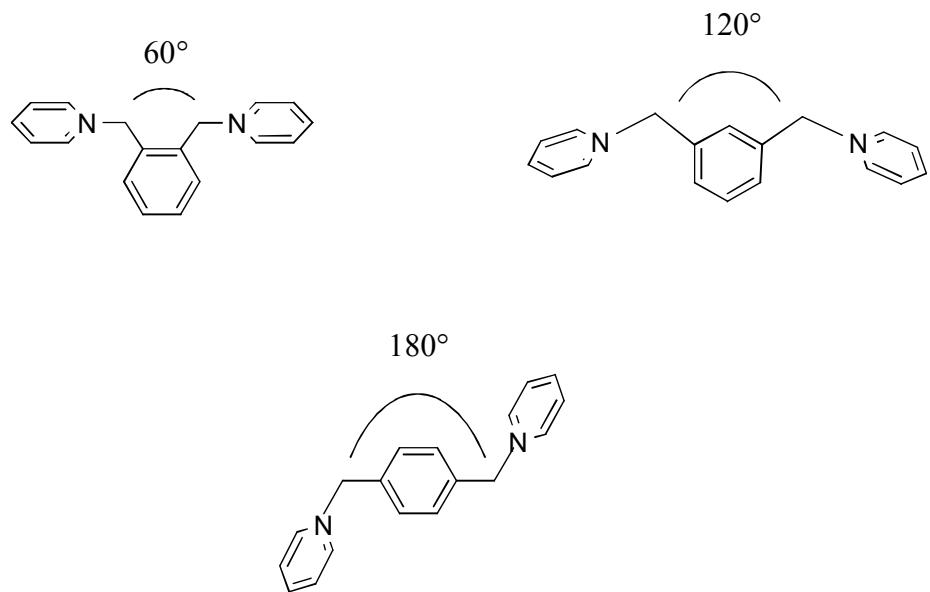
Pro návrh struktury oximového reaktivátoru se hodnotí vliv počtu pyridinových kruhů (mono a bis kvartérní reaktivátory), délky spojovacího řetězce, počtu a umístění oximových skupin [31]. V této práci byla na základě naměřených experimentálních dat potvrzována vhodná struktura reaktivátoru. Bylo potvrzeno, že jedna až dvě oximové skupiny jsou dostatečné pro dosažení vysoké reaktivační účinnosti, další oximová skupina již nezvyšuje účinnost reaktivace (K027, K048, K265). Je to pravděpodobně způsobeno pomalejším průnikem reaktivátoru do aktivního centra enzymu. Přítomnost oximové (hydroxyiminomethylové) skupiny je tedy nutností, *in vivo* se přemění na oximátový aniont, který nukleofilně atakuje kovalentní vazbu E+I, aktivátory bez oximové skupiny jsou jen velmi málo účinné [32].

Z hlediska umístění oximové skupiny v molekule reaktivátoru se setkáváme s dalším strukturálním faktorem, který se podílí na schopnosti reaktivovat inhibovanou AChE. Reaktivátory bývají nejčastěji substituované na pyridinovém jádře a to v polohách 2, 3, 4, nicméně se můžeme setkat i s oximovou skupinou mimo heterocyklus, a to na spojovacím řetězci mezi dvěma jádry (K120, K121). Z experimentálních dat se dá říci, že nejvýhodnější poloha pro substituci na jádře v rámci reaktivace je poloha 4 u

monosubstituovaných reaktivátorů (K027, K201, K385) a u disubstituovaných látek pak kombinace poloh (2,2 – K184), (2,4 – K208) a (3,4 – 285), naopak jako nevýhodná se jeví kombinace (2,3 – K183, K283). Skupina látek s oximovou skupinou mimo pyridinové jádro, tedy na spojovacím řetězci, nepatřila mezi nejlepší reaktivátory (K120, K121).

Dalším důležitým strukturním prvkem reaktivátorů je kvartérní dusík. Je nutný pro vazbu reaktivátoru ve vazebném místě inhibovaného enzymu. Mono i biskvartérní reaktivátory špatně procházejí přes HEB, ale je potvrzeno mnohými experimenty, že biskvartérní reaktivátory (K018, K180, K208, K285) jsou lepší, i když přecházejí přes HEB o více než polovinu méně oproti monokvartérním reaktivátorům (K169, K121, K006).

Ve struktuře reaktivátorů OFI můžeme najít i závislost účinnosti reaktivace na délce a rigiditě spojovacího řetězce mezi jádry. V případě n-methylenového řetězce má křivka vztahu mezi počtem methylenových jednotek typický zvonovitý tvar s maximem v oblasti 3 – 4 methylenových jednotek [33]. Toto pravidlo platí především u spojovacích můstků s nasyceným uhlíkatým řetězcem. Můstky, které buď obsahují násobnou vazbu, nebo heteroatom toto pravidlo nepotvrzují. Tento fakt se mi podařilo prokázat i v rámci vlastních experimentů. Dle povahy spojovacího můstku může dojít ke snížené otáčivosti mezi jádry. U těchto látek je spojovacím můstkem především but-2-enový řetězec, a nebo xylenový spojovací můstek. Zatím co u but-2-enových řetězců byla naměřena jen mírná reaktivace (K281, K285, K075), u xylenových spojovacích řetězců bylo procento reaktivace vyšší, a to u všech tří inhibitorů v obou koncentracích. Literárně je u tohoto typu reaktivátorů popsána vyšší míra inhibice AChE než v případě samotných inhibitorů [34], ale v případě tohoto experimentu a zvolených koncentracích, se u testovaných látek tento jev neprojevil. Xylenový řetězec může mít více možností spojení, a tím je dán i úhel, který svírají jednotlivé volně otáčivé vazby [35]. Otáčivost vazby je demonstrována v obrázku číslo 6.



Obr. 6: Otáčivost vazeb mezi xylenovými jádry.

5. Závěr

Z hlediska použitých inhibitorů lze shrnout, že DFP inhibovanou AChE reaktivují biskvartérní reaktivátory s dvěma oximovými skupinami a xylenovým nebo but-2-enovým řetězcem, dále biskvartérní sloučeniny s jednou oximovou skupinou a propanovým spojovacím řetězcem, monokvartérní s větším substituentem na dusíku pyridinového jádra jako je benzyl (K348, K349). Naproti tomu se AChE inhibovaná paraoxon ethylem a stejně tak i paraoxon methylem dala ve větší míře reaktivovat pouze biskvartérními reaktivátory. Počet oximových skupin se nezdá být důležitým faktorem předurčujícím účinnost těchto reaktivátorů pro paraoxon methyl a ethyl.

6. Přílohy

Seznam výstupů v odborných periodících:

1. DRTINOVA, L., OPLETALOVA, V., POHANKA, M., Přehled organofosfátových a karbamátových pesticidů schválených v České republice. *Zpravodaj vojenské farmacie* **2008**, 18(3), 29-32.
2. DRTINOVA, L., OPLETALOVA, V., POHANKA, M., Organofosfátové pesticidy. *Vojenské zdravotnické listy* **2009**, 78 (2), 54-59.
3. POHANKA, M., DOBES, P., DRTINOVA, L., KUČA, K., Nerve agents assay using cholinesterase based biosensor. *Electroanalysis* **2009**, 21(10), 1177-1182.
4. POHANKA, M., DRTINOVA, L., KUČA, K., Acetylcholinesterase based assay of eleven organophosphorus pesticides: finding of assay limitations. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2009**, In press.
5. POHANKA M., DROBIK, O., KREKROVA, Z., DRTINOVA, L., KUČA, K., ZDAROVA-KARASOVA, J., Current improvement of cholinesterase based biosensors. *Toxcon, Interdisciplinary Toxicology* **2009**, 2(2), 140-141.

Literatura:

1. DORLAND, N. W., *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*, 30th rev. ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2007.
2. TAGUCHI, R., SUZUKI, K., NAKABAYASHI, T., IKEZAWA, H., Acetylcholinesterase release from mammalian erythrocytes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis* and characterisation of the released enzyme. *J. Biochem.* 1984, *96*(2), 437-446.
3. KAUSHIK, R., ROSENFELD, C. A., SULTATOS, J. G., Concentration-dependent interactions of the organophosphates chlorpyrifos oxon and methyl paraoxon with human recombinant acetylcholinesterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007, *221*(2), 243-250.
4. NAVRÁTIL, L., BAJGAR, J., *Prostaglandiny v klinické medicíně: cholinesterázy a jejich klinický význam*, 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství 1989.
5. JOKANOVIĆ, M., STOJILJKOVIĆ, M. P., Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in the treatment of organophosphate poisoning. *Eur. J. Pharmacol.* 2006, *553*(1-3), 10-17.
6. VOKURKA, M., HUGO, J., *Velký lékařský slovník*, 7. aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2007.
7. LÜLLMANN, H., MOHR, K., HEIN, L., *Barevný atlas farmakologie*, 3. české vyd. Praha: Grada, 2007.
8. RAND, J. B., Acetylcholine (January 30, 2007), *WormBook. The online Review of C. elegans Biology* [online] © J. B. Rand 2007 [cit. 2010-04-30]. Dostupné z:
http://www.wormbook.org/chapters/www_acetylcholine/acetylcholine.html.

9. MILLODOT, M., *Dictionary of Optometry and Visual Science*, 7th ed. Oxford: Elsevier/Butterworth-Heinemann, 2008.
10. ALBERTS, B., KOTYK, K., BOUZEK, B., HOZÁK, P., *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*, 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998.
11. LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M., *Farmakologie a toxikologie*, 1. české vyd. Praha: Grada, 2002.
12. GOEL, A., AGGARWAL, P., Pesticide poisoning. *Natl. Med. J. India* 2007, 20(4), 182-191.
13. Seznam registrovaných přípravků a evidovaných prostředků na ochranu rostlin. In *Věstník státní rostlinolékařské správy* 2008, roč. 5, zvláštní vydání, leden 2008. [online] © Státní rostlinolékařská správa [cit. 2010-04-30]. Dostupné z:
http://www.srs.cz/portaldoc/pripravky_na_ochranu_rostlin/informace_pro_zemedelce/registrace/VESTNIK_2008_LEDEN.pdf
14. Směrnice rady ze dne 15. července 1991 o uvádění přípravků na ochranu rostlin (91/414/EHS). In *Úřední věstník Evropských společenství I. 230/1 z 19. 8. 1991*[online] © Evropská unie 1995-2010 [cit. 2010-04-30]. Dostupné z:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=DD:03:11:31991L0414:CS:PDF>.
15. MINTON, N. A., MURRAY, V. S., A review of organophosphate poisoning, *Med. Toxicol. Adverse Drug Exp.* 1988, 3(5), 350-375.
16. BAJGAR, J., KASSA, J., CABAL, J., *Katedra toxikologie – KTOX (K-304), Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany Hradec Králové, Česká republika*, 1. vyd. Praha: Ministerstvo obrany České republiky – Agentura vojenských informací a služeb, 2007.
17. KOELLE, G. B., Pharmacology of organosphosphates. *J. Appl. Toxicol.* 1994, 14(2), 105-109.

18. PATOČKA, J., *Vojenská toxikologie*, 1. vyd. Praha: GRADA, 2004.
19. VIŠŇOVSKÝ, P., *Farmakologie látek znečišťující životní prostředí*, 1. vyd. Praha: Karolinum, 1997.
20. BAJGAR, J., *Historie používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu*, 1. vyd. Hradec Králové: Vojenská lékařská akademie, 1996.
21. BALÍKOVÁ, M., *Forenzní a vojenská toxikologie: laboratorní toxikologická vyšetření*, 1. vyd. Praha: Galén, 2004.
22. PROKEŠ, J., *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Praha: Galén, 2005.
23. SIMPSON, W. M. Jr., SCHUMAN, S. H., Recognition and management of acute pesticide poisoning. *Am. Fam. Physician* 2002, 65(8), 1599-1604.
24. BAJGAR, J., KIML, J., Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie. In *Novinky v medicíně*, sv. 34. Praha: Avicenum, 1985.
25. FLORUS, S., Aktuální problémy proti ZHN. *Listy univerzity obrany* 2007, 3(11), 5.
26. BAJGAR, J., Ochrana mozkové acetylcholinesterázy proti inhibici látkou VX u laboratorních potkanů. *Vojenské zdravotnické listy* 2009, 78(2), 60-65.
27. VOPRŠALOVÁ, M., ŽÁČKOVÁ, P., *Základy toxikologie pro farmaceuty*, 1. vyd. Praha: Karolinum, 1996.
28. KASSA, J., KUNEŠOVÁ, G., Comparison of the neuroprotective effects of the newly developed oximes (K027, K048) with trimesoxime in tabun-poisoned rats, *J. Appl. Biomed.*, 2006, roč. 4, č. 3, s. 123-134.

29. EDDLESTON, M., BUCKLEY, N. A., EYER, P., DAWSON, A. H., Medical management of acute organophosphorus pesticide poisoning, *Lancet*, 2008, 371 (9612), 597–607.
30. NAGUIB, M., SAMARKANDI, A. H., BAKHAMEES, H. S., TURKISTANI, A., ALHARBY, S. W., Edrophonium and human plasma cholinesterase combination for antagonism of mivacurium-induced neuromuscular block. *Br. J. Anaesth.* 1996, 77(3), 424-426.
31. KUČA, K., JUN, D., MUSÍLEK, K., BAJGAR, J., Reactivators of tabun-inhibited acetylcholinesterase: structure, biological activity relationship. *Front. Drug Des. Discover.* 2007, 3(1), 381-394.
32. SU, C. T., WANG, P.-H., LIU, R.-F., SHIH, J.-H., MA, C., LIN, C.-H., LIU, C.-Y., WU, M.-T., Kinetic studies and structure—activity relationships of bispyridinium oximes as reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds. *Toxicol. Sci.* 1986, 6(3), 506-514.
33. HOLAS, O., *Vztah mezi strukturou účinností potenciálních reaktivátorů acetylcholinesterasy I.* Diplomová práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta, 2008.
34. KUČA, K., JUN, D., MUSÍLEK, K., Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini Rev. Med. Chem. Mini Rev. Med. Chem.* 2006, 6(3), 269-277.
35. MUSÍLEK, K., KUČA, K., DOHNAL, V., JUN, D., MAREK, J., KOLEČKÁŘ, V., Two step synthesis of a non-symmetric acetylcholinesterase reactivator. *Molecules* 2007, 12(8), 1755-1761.