

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmakologie a toxikologie

**HODNOCENÍ EFEKTIVITY ANTIDOTNÍ TERAPIE
EXPERIMENTÁLNÍ INTOXIKACE TABUNEM NA
ZÁKLADĚ NEUROBEHAVIORÁLNÍCH METOD**

(Diplomová práce)

ve spolupráci s
UNIVERZITOU OBRANY V BRNĚ
FAKULTOU VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedrou toxikologie

Školitelé: Mgr. Gabriela Kunešová, PhD.
Prof. MUDr. Peter Višňovský, CSc.
PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

OBSAH:

1 Anotace práce	4
Study anotation	5
2 Úvod do řešené problematiky	7
2.1 Užívání chemických zbraní v minulosti	7
2.2 Představitelé a jejich charakteristika	10
2.2.1 Základní představitelé	10
2.2.2 Fyzikálně – chemické vlastnosti	11
2.2.3 Využití látek obdobných struktur v jiných odvětvích	12
2.3 Charakteristika látky tabun	14
2.4 Farmakokinetická charakteristika	15
2.5 Farmakodynamická charakteristika	16
2.5.1 Acetylcholin	17
2.5.2 Acetylcholinové receptory	18
2.5.3 Acetylcholinesteráza	19
2.5.4 Interakce AChE a NPL	21
2.6 Problematika intoxikace NPL	23
2.6.1 Klinický obraz akutní intoxikace	23
2.6.2 Pozdní neurotoxický efekt	25
2.7 Problematika terapie otrav NPL	26
2.7.1 Nеспецифická terapie otrav NPL	26
2.7.2 Funkční antidota v terapii otrav NPL	27
2.7.3 Kauzální antidota v terapii otrav NPL	29
2.7.4 Další možnosti doplnění terapie	30
3 Materiál a metody	32
3.1 Zvířata	32
3.2 Chemikálie	32
3.3 Metodika	34
3.3.1 Funkční observační baterie	34
3.3.2 Vlastní provedení pokusu	40
3.3.3 Statistické hodnocení	40
4 Výsledky	42
4.1 Hodnocení experimentu po 24 hodinách	42
4.2 Hodnocení experimentu po 7 dnech	44
5 Diskuse	46
6 Závěr	53
7 Poděkování	55
8 Seznam použité literatury	56

SEZNAM ZKRATEK UŽITÝCH V TEXTU:

A	atropin
AČR	Armáda České Republiky
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChRs	acetylcholinové receptory
BuChE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervový systém
GA	tabun
GB	sarin
GD	soman
GF	cyklosarin
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
CHZ	chemické zbraně
i.m.	intramuskulární způsob aplikace látky
i.v.	intravenózní způsob aplikace látky
LD ₅₀	střední letální dávka
mAChRs	muskarinové acetylcholinové receptory
nAChRs	nikotinové acetylcholinové receptory
NPL	nervově paralytická látka
NT	neurotransmitter
OFI	organofosforové insekticidy
OL	otravná látka
p.o.	perorální způsob aplikace látky

1 ANOTACE PRÁCE:

Na samcích potkanů kmene Wistar byla testována účinnost oximových reaktivátorů enzymu acetylcholinesterázy (AChE) hodnocením parametrů neurotoxicity in vivo. Jako modelová látka ze skupiny organofosfátů byl zvolen tabun (látka GA, O-ethyl dimethylamidokyanofosfát) o koncentraci 1 LD₅₀, jehož současné světové zásoby představují stálé riziko zneužití v lokálních válečných konfliktech, teroristy nebo při likvidaci těchto zásob v případě náhodné expozice.

V terapii intoxikovaných zvířat byly použity reaktivátory AChE oximového typu: HI – 6, obidoxim, a nově syntetizované látky KO75 a KO74, které byly podávány v ekvimolárních množstvích, vždy v kombinaci s běžně v terapii užívanou anticholinergní látkou atropinem.

Jako metodika byla použita Funkční pozorovací baterie, soubor vybraných dílčích metod a parametrů vhodných pro hodnocení sensorických, motorických a autonomních nervových funkcí zvířat. Ukazatele tabunem navozené neurotoxicity byly hodnoceny 24 hodin a 7 dní po intoxikaci, a byly porovnávány s daty kontrolní skupiny (zvířatům byl místo účinných látek podán fyziologický roztok) a daty skupiny intoxikované tabunem bez podání následné terapie.

Výsledky této studie prokázaly pozitivní terapeutický účinek testovaných reaktivátorů AChE v porovnání s neléčenou skupinou, nicméně žádný z oximů neeliminoval všechny ukazatele tabunem navozené neurotoxicity bezesbytku. K úmrtí zvířat došlo pouze ve skupině, které nebyla podána terapie. Jako nejperspektivnější z těchto oximů se nám jevil obidoxim. Úprava sledovaných sensorických, motorických a autonomních nervových funkcí organismu po aplikaci obidoximu byla srovnatelná s novou látkou KO75. Nejméně účinnou látkou při intoxikaci tabunem se nám jevil oxim HI-6.

Odhalení terapeuticky nejvíce účinného oximu jakožto reaktivátoru tabunem inhibované AChE umožní následné optimální nastavení terapie otravy touto nervově paralytickou látkou. Již v minulosti byla publikována odlišná reaktivační účinnost jednotlivých oximů, což je dáno jednak jejich chemickou strukturou a jednak typem a strukturou samotné otravné látky.

Nejvyšší prioritou tohoto výzkumu je vytipování nejúčinnější kombinace látek ve smyslu jejich terapeutického využití při zasažení živé síly tabunem, která zvýší pravděpodobnost přežití intoxikovaných jedinců a sníží možnost vzniku dlouhodobého a nevratného poškození organismu.

STUDY ANOTATION:

The terrorism is a very serious problem in this time. The organophosphorus nerve agents are one of the eventualities to use for attacks on civilians by terrorist or on soldiers in the war. The people after attack can die or be handicapped. The therapy is not still effective as we need, that is why we look for new substances. In this study we looked for effective antidotal substances against tabun. Intoxication one of the very toxic organophosphorus compound for nervous system.

We tested substances, oximes, in animals in vivo. In this test, we used rat males from the tribe Wistar. The animals were exposed to the dose of 1 LD₅₀ of tabun. For the therapy, we used reactivators of an enzyme acetylcholinesterase (AChE), the oximes: HI – 6, obidoxime and new structures KO75 and KO74. These substances were administered in equimolar doses and were combined with atropine.

We studied stage of elimination of the tabun neurotoxicity after antidotal use. The index of neurotoxicity was recorded after 24 hours and 7 days. The results were

confronted with results of control. Control was group where we used only physiological solution instead of drugs.

The results of this study demonstrated positive therapeutic effect of reactivators AChE, but the neurotoxicity was not eliminated completely. Obidoxime seemed to be the most hopeful of these substances. The parameters of sensory, locomotor and autonomic nervous system in the treated with obidoxime were comparable to the results of animals administered with new structure KO75. After 7 days were their parameters comparable. HI - 6 wasn't very effective.

To identify of the most effective reactivators to AChE after the tabun intoxication is necessary for development of the optimal therapy. The reactivation effect of particular oximes is not same, it depends on chemical structure of oximes and toxic substances too.

In near future, we will study a new types of oximes and the other therapeutic effective substances. The other substances, which we can use in therapy with oximes are anticholinergics and anticonvulsives.

The most important for us, is to discover the most effective oximes for tabun and to create an effective therapy for people who were poisoned by organophosphorus nerve agents. The optimal therapy would improve the chance on survive and would reduce irreversible damages.

2 ÚVOD DO ŘEŠENÉ PROBLÉMATIKY:

2.1 Používání chemických zbraní v minulosti:

Z historických pramenů víme o tom, že se již asi 2000 let př. n. l. používaly toxické dýmy obsahující i vyluhované extrakty z rostlin, které vyvolávaly hromadný spánek. Tyto dýmy jsou popisovány v čínských pramenech z doby dynastie Sun (Bajgar 1996). Další odkazy nacházíme i z dob starověkého Řecka a Říma.

První použití otravných látek (OL) na evropské půdě bylo produktem české vynalézavosti (Prokeš 2005). Při obléhání Karlštejna v r. 1422 do něj Pražané (husité) vedení Zikmundem Korybutovičem vrhli 1822 soudků s obsahem pražských žump. Zápach v hradu byl prý nesnesitelný a sirovodík uvolněný z fekálií zřejmě způsobil intoxikace – obráncům začaly vypadávat vlasy, dostavily se hromadné žaludeční a střevní potíže (Bajgar 1996). Šlo tedy o kombinaci chemických a biologických prostředků (Prokeš 2005).

Poprvé byla moderní chemická zbraň (CHZ) v masovém měřítku použita během 1. světové války. Za počátek éry CHZ je považován útok německých vojsk s použitím chlóru dne 22. 4. 1915 u belgického města Ypres v západních Flandrech proti Francouzům (Bajgar, 1996). Výsledkem plynového útoku bylo 15 000 zasažených osob, z nichž do 2 dnů zemřelo 5 000 osob a dvojnásobek byl těžce zasažen s doživotními následky (Prokeš 2005). Tento silný účinek byl způsoben i tím, že francouzská vojska neměla žádné ochranné prostředky (Bajgar 1996). Na stejném místě, dne 12. 7. 1917 byl poprvé užit německou armádou bojový plyn, který byl podle Ypres nazvaný yperit (Kočí 2003). Ačkoli byl yperit zařazen do chemické výzbroje válčících mocností teprve v závěru 1. světové války, převyšovaly zdravotnické ztráty jím způsobené osmkrát ztráty vyvolané všemi ostatními otravnými látkami za celý

průběh války (Kassa 1993). Proto byl také někdy nazýván „králem plynů“ (Prymula 2002).

Mezi dvěma světovými válkami se intenzivně vyhodnocovaly zkušenosti z dosavadního použití chemických látek a zároveň se hledaly nové a účinnější chemikálie. Prvenství v této oblasti drží Gerhard Schrader, chemik koncernu IG Farben, který v roce 1935 popsal při výzkumu nových insekticidů významné toxické účinky u N, N-dimethylamidofosforyl fluoridu (Bajgar 1996). Schraderův výzkum později vedl k cílené syntéze nervově paralytických látek (NPL) (Prymula 2002). Tato skupina látek byla známa již od počátku 20. století, ale až tento objev otevřel cestu k cílené syntéze těchto velmi účinných látek (Bajgar 1996).

První z těchto látek se označují jako G – série nervově paralytických látek, protože je syntetizovali němečtí vědci (German scientists). Jako první byl připraven tabun (GA) v roce 1936. Sarin (GB) byl objeven v roce 1938, následoval soman (GD) v roce 1944 (Koelle 1963). Soman byl již připraven na podkladě pečlivého farmakologického testování, jedná se o analog sarinu, který je podstatně jedovatější. Jako poslední byl připraven méně známý cyklosarin (GF) v roce 1949. Takzvaná V – série, která zahrnuje látku VX byla objevena později (Zajtchuk 1997). Byla syntetizována na základě tajně získaných objevů IG Farben a po rozsáhlých farmakologických a chemických studiích Američany a Brity (Prymula 2002). VX je dodnes nejtoxičtější známým organofosfátem pro člověka (Prokeš 2005).

V období 2. světové války nebyly CHZ prakticky použity, byl jim však přikládán velký význam a obě strany konfliktu se připravovaly na možnost užití těchto látek. Ke konci války projevovali velkou aktivitu v této problematice Japonci, intenzivně sledovali možnosti využití chemických sloučenin i biologických zbraní i za použití lidí jako pokusného materiálu (Bajgar 1996).

Období po 2. světové válce je charakterizováno dalším výzkumem v oblasti NPL a jejich hromadění velmocemi, což bylo také podporováno tzv. studenou válkou. V roce 1986 probíhala jednání Konference o odzbrojení v Ženevě. Spojené státy a Sovětský svaz uskutečnily ukázkou svých CHZ a metod k jejich likvidaci. V roce 1989 proběhla konference v Paříži, která sehrála významnou úlohu v úsilí o dosažení zákazu a likvidace CHZ. A v roce 1993 byla podepsána Úmluva o zákazu chemických zbraní (Prymula 2002).

Problematika otravných látek a CHZ je i dnes velmi aktuální. Velmoce stále vlastní obrovská množství chemické munice. Jedná se o staré zásoby, které nejsou určeny k použití a mají být likvidovány. I přes sepsání a podepsání celosvětové Úmluvy o zákazu chemických zbraní, hrozí zneužití kdekoli na světě a to nejen na poli válečném (Kunešová 2005). Je známo, že sovětská armáda zneužívala chemické zbraně v Afganistanu. Události na Blízkém východě v letech 1980–1988 (irácko – iránská válka) i 1990–1991 (válka v zálivu – Gulf War) potvrdily, že se nejedná pouze o velmoce (Prokeš 2005).

Vzhledem k jejich velmi snadné syntéze a použití mohou být tyto látky zneužity i různými teroristickými skupinami. V letech 1994 a 1995 došlo v japonských městech Matsumoto a Tokyo ke dvěma teroristickým útokům proti civilnímu obyvatelstvu (Morita 1995, Ohbu 1997).

Vzhledem k současné mezinárodní politické situaci i historickým skutečnostem je kladen velký tlak na výzkum vojensky použitelných chemických zbraní a vývoj léčebných prostředků proti jejich účinkům.

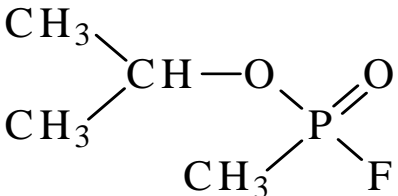
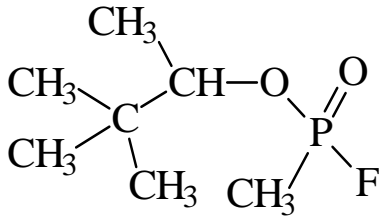
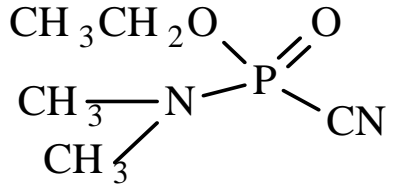
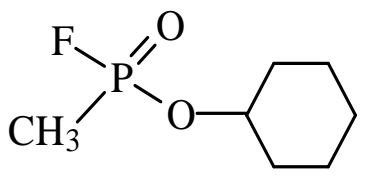
2.2 Představitelé a jejich charakteristika:

2.2.1 Základní představitelé:

Nervově paralytické látky (NPL) patří mezi organické sloučeniny fosforu, vyznačující se vysokou toxicitou vůči teplokrevným organismům, a tedy i savcům. Pro svou jednoduchou výrobu, snadnou použitelnost a rychlý nástup účinků patří k nejvíce nebezpečným bojovým chemickým látkám.

Dělí se na dvě skupiny, které jsou obecně označovány jako G látky a V látky. Mezi zástupce G látek patří: tabun (GA: O – ethyldimethylamidokyno-fosfát), sarin (GB: O – isopropylmethylfluorofosfonát), cyklosin (GF: cyklohexylmethylfluorofosfonát) a soman (GD: O – pinakolylmethylfluorofosfonát) (Patočka 2004a).

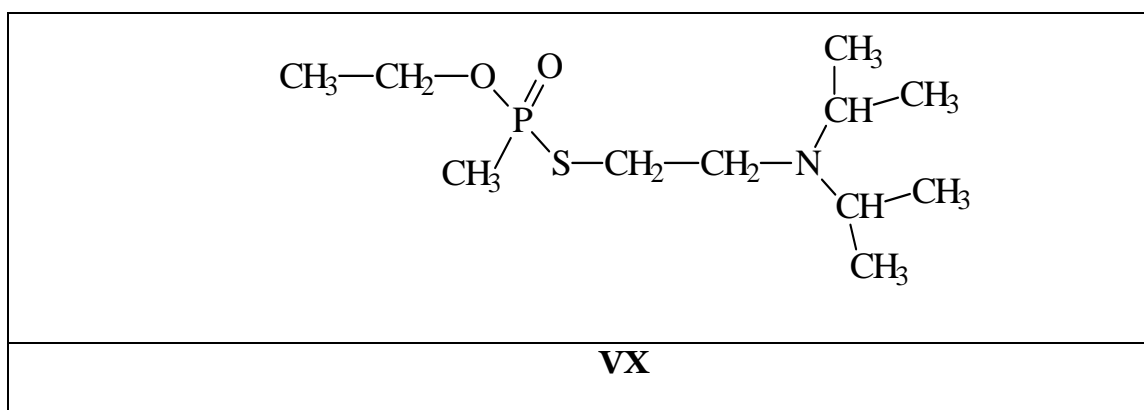
Tabulka 1: Struktury vojenských organofosforových sloučenin, G serie:

	
Sarin	Soman
	
Tabun	Cyklosin

Vývoj nových OL s nervově paralytickým účinkem byl po roce 1945 orientován především na zvýšení toxicity a permeability neporušeným kožním povrchem. V USA

byly připraveny látky vhodné pro bojové použití, které jsou v odborné literatuře uváděny pod označením V látky (Kassa 1993). Největšího vojenského významu dosáhla látka VX: O – ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl) - methylthiofosfonát.

Tabulka 2: Struktura vojenských organofosforových sloučenin, V serie:



2.2.2 Fyzikálně – chemické vlastnosti:

Látky řazené do G serie můžeme charakterizovat jako bezbarvé kapaliny podobné vodě. I ve vyšších koncentracích mají prakticky zanedbatelný zápach, pouze sarin se vyznačuje slabou vůní po ovoci (Kassa 1993). Jsou rozpustné ve vodě a dobře v organických rozpouštědlech. Je pro ně charakteristická vysoká těkavost, takže nejpravděpodobnější branou vstupu do organismu jsou dýchací cesty (Patočka 2004a).

Látka VX je bezbarvá, méně pohyblivá kapalina bez výraznějšího zápachu. Ve vodě je špatně rozpustná, dobře v organických rozpouštědlech a tucích. Je pro ni charakteristická nízká těkavost, takže zamoří ovzduší i vodu na dlouhou dobu, v zimě až na dobu 16 týdnů (Kassa 1993).

Orgánofosfáty mají vysokou lipofilitu (nemají ve své molekule kvarterní dusík), velmi snadno se vstřebávají a prostupují všemi bariérami včetně neporušené kůže

(kontaktní jedy – V-látky) (Lincová 2002). Při absorpci a penetraci jednotlivými tkáněmi nevyvolávají žádné závažnější morfologické změny (Kassa 1993). Intoxikace organismu se vyvíjí velmi rychle, k úmrtí může dojít i během několika minut.

2.2.3 Využití látek obdobných struktur v jiných odvětvích:

Sloučeniny stejné základní struktury jsou běžně používány i v jiných odvětvích. Jsou to čteně užívané technologicky pomocné látky v průmyslu, hlavně pak změkčovadla a hydraulické kapaliny.

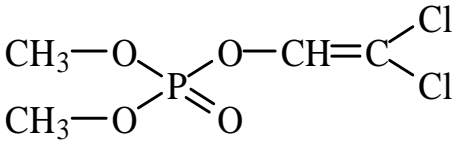
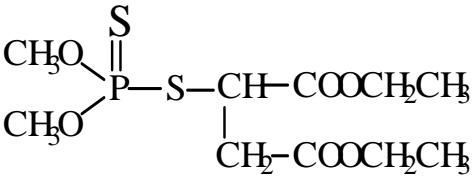
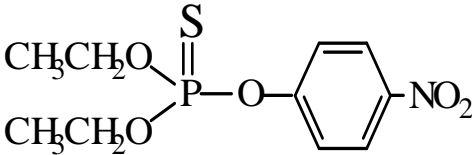
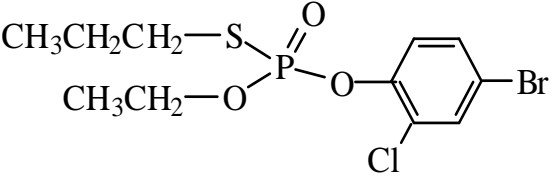
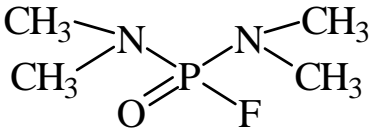
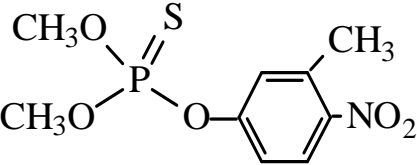
Organické deriváty fosforu byly v minulosti často užívány k veterinárním účelům. V dnešní době jsou již používána pouze dvě léčiva z této skupiny. Metrifonát je léčivem endoparazitálních i ektoparazitálních infekcí zvířat, využíván je více jako antiectoparazitikum (Lamka 1998). Druhým léčivem je pak Dichlorvos, užíván je jako endoparazitikum.

Nejširšího použití dosáhly tyto látky v zemědělství jako insekticidy (látky k hubení hmyzu) – které jsou běžně dostupné – např. Metathion, Malathion, Actellic, In – stop aj. (Patočka 2004a). Insekticidy začaly být ve větším měřítku používány od 2. světové války. Organické sloučeniny fosforu, zásluhou vysoké insekticidní účinnosti, nahradily méně toxické chlorované uhlovodíky. Skupina organofosfátů se liší od chlororganických insekticidů rychlým rozpadem, tedy nedochází ke kumulaci v životním prostředí a organismech). V zemích, kde se pesticidy tohoto typu používají, zapříčiňují každoročně velký počet profesionálních, suicidálních a náhodných otrav (Vopršalová 1996).

Otravy organofosforovými insekticidy (OFI) představují celosvětový zdravotnický problém – ročně se jimi otráví kolem 3 000 000 lidí a z nich přibližně 200 000 na následky otravy zemře (Karralliedde 1999). Profesionální a náhodné

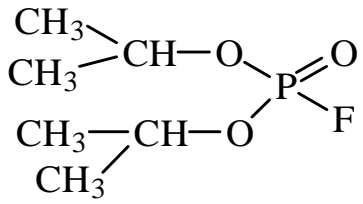
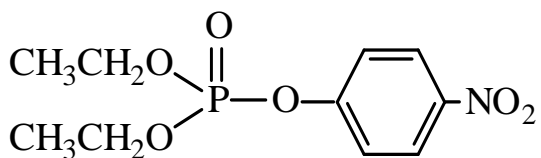
otravy jsou v rámci celosvětového měřítka nejčastější v rozvojových zemích jako důsledek selhání bezpečnosti práce v zemědělství. OFI bývají též často zneužívány v sebevražedném úmyslu (Eddleston 2000).

Tabulka 3: Struktury veterinárních organofosforových sloučenin a insekticidů:

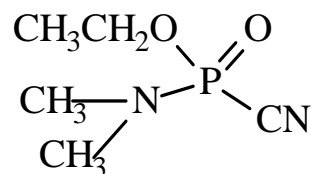
	
Dichlorvos	Malathion
	
Parathion	Profenofos
	
Dimefox	Fenitrothion

Dále pak jsou tyto látky používány k lékařským a vědeckým účelům, jsou studovány jako jedna z možných cest terapie a prevence demence Alzheimerova typu. V humánní medicíně mohou být a jsou využívány jako ophtalmologika.

Tabulka 4: Struktury v oftalmologii užívaných organofosforových sloučenin:

	
DFP	Paraoxon

2.3 Charakteristika látky tabun:



Obr. 1: Tabun

Tabun (GA: O – ethyldimethylamidokyamofosfát, Obr. č. 1) patří do skupiny NPL, podskupiny G-látek. Jejich akutní toxicita je velmi vysoká a závisí na bráně vstupu do organismu. Nejzávažnější branou vstupu vzhledem k vysoké těkavosti látek jsou dýchací cesty. Střední letální koncentrace v ovzduší vedoucí po 1 minutové expozici ke smrti 50% exponovaných nechráněných osob se pohybuje mezi 0,03 a 0,08 mg.l⁻¹. Střední letální dávka při zamoření nechráněné kůže se pohybuje mezi 0,7 až 7,0 mg.kg⁻¹ hmotnosti exponovaného jedince (Kunešová 2005).

Přestože tabun patří mezi nejstarší nervově paralytické látky, antidotní terapie akutních otrav touto noxou nebyla dosud uspokojivě vyřešena. Obtížná reaktivovatelnost tabunu vyplývá jednoznačně z jeho struktury, která je odlišná od dalších látek z série G. Jednou z nejdůležitějších odlišností v jeho chemické struktuře je přítomnost dimethylamidové skupiny (CH₃)₂N- místo methylové CH₃-. Tato

diference je zřejmě příčinou rozdílu v reaktivitě inhibovaného enzymu s pyridiniovými oximy. Pro reakci látek typu oximu, resp. oximátového aniontu, který je účinnou formou reaktivátoru, je nezbytný elektronový deficit ve vazbě, která má být štěpena. U tabunu je však vznikající elektronová deficiencie eliminována volným elektronovým párem amidického dusíku a atak nukleofilu je tím znemožněn nebo alespoň ztížen (Cabal 1999).

2.4 Farmakokinetická charakteristika:

Orgánofosfáty se jako vysoce lipofilní látky velice rychle absorbují, pokud neobsahují v molekule kvarterní dusík (např. echothiofonát). Do organismu savců se dostávají všemi branami vstupu včetně spojivek a neporušené kůže (Vopršalová 1996). Perkutánní absorpci navíc usnadňují různá rozpouštědla, která mohou být například součástí insekticidních přípravků (chlorované uhlovodíky, xylen, toluen). Při expozici organismu je kromě intravenózního (i. v.) podání pozorováno zpoždění, které je dáno průnikem NPL biologickými membránami (Patočka 2004a). Nástup příznaků intoxikace a jejich intenzita závisí na dávce a bráně vstupu organofosfátů do organismu. Při inhalaci se příznaky objevují již po několika minutách, při perorálním (p.o.) podání za 15 minut až 1 hodinu, po kožní absorpci za 2 – 3 hodiny (Vopršalová 1996).

Po vstupu NPL do intoxikovaného organismu zde probíhají další tři fáze účinku NPL: transport, metabolizace a vlastní toxický efekt (Patočka 2004a). Transport NPL je zajišťován krevním oběhem, jímž je látka zanesena na místo metabolického nebo toxického efektu.

Metabolismus organofosfátů je pak výsledkem biochemických reakcí, jejichž následkem z toxikologického hlediska může být detoxikace mateřské látky, ale

v některých případech může dojít k zachování původní toxicity nebo tvorba metabolitů s vyšším účinkem a i vyšší toxicitou - tento mechanismus je znám u organofosforových insekticid, např. paraoxon vzniklý z parathionu (Vopršalová 1996). NPL (zejména soman) se mohou deponovat v tukové tkáni, ze které jsou postupně vyplavovány, tím dojde k prodloužení účinků toxické látky na organismus.

Vlastní toxický efekt je pak v centrálním a periferním nervovém systému a na nervosvalové ploténce, kde NPL inhibuje acetylcholinesterázu (AChE), která již nemůže štěpit acetylcholin (ACh) a na cholinergních synapsích se projeví důsledky jeho zvýšené koncentrace (Patočka 2004a).

Vlastní toxický efekt je realizován jen zlomkem podané dávky NPL, zbytek podané dávky představují ztráty, vznikající nejrůznějším způsobem. Ztráty mohou dosáhnout podle druhu NPL až 99 %. V krevním oběhu reaguje NPL s esterázami či dalšími enzymy (butyrylcholinesteráza: BuChE, karboxylesteráza a fosforylfosfatáza v plazmě), vazba NPL na tyto enzymy nevyvolá žádné klinické příznaky, takže tyto působí jako scavengery (vychytávači). Vážou na sebe část dávky, která vstoupila do vnitřního prostředí organismu a vyřazují ji z vlastního toxického účinku. Je to velmi důležitý děj, protože se předpokládá, že pouze 1 – 3 % z celkové dávky se dostane na místo toxického účinku, tedy k cholinergním synapsím periferního a centrálního nervového systému (Patočka 2004a).

2.5 Farmakodynamická charakteristika:

Tabun patří mezi nervově paralytické látky G skupiny, tyto látky mají společný mechanismus působení v organismu a to je inhibice životně důležitého enzymu AChE. AChE v organismu zodpovídá za hydrolýzu klíčového mediátoru nervového systému ACh (Vopršalová 1996). Pro velmi pevnou vazbu na molekulu AChE

přetrvává jejich účinek dlouhodobě (dny, týdny) a mohou se objevit i pozdní, zejména neurotoxické komplikace (Lincová 2002). Z toho vyplývá, že za akutní projevy intoxikace a pozdní projevy zodpovídá tělu vlastní ACh. Podstatou klinického obrazu otravy organofosfáty je tedy nahromadění ACh na místech jeho fyziologického účinku (Vopršalová 1996).

2.5.1 Acetylcholin:

ACh je neurotransmiterem (NT) parasymptiku. Uvolňuje se na všech pregangliových zakončeních, na postgangliových zakončeních parasymptiku a některých vláken symptiku - vazodilatační vlákna cév kosterních svalů, neurony potních žláz (Trojan 2003). ACh je syntetizován v cytoplazmě neuronů z acetyl – CoA a cholinu. Limitujícím krokem v tomto procesu je rychlost přívodu cholinu (Martínková 2002).

Vzniklý NT je pak aktivně přenášen do vezikul, ve kterých je skladován. Množství ACh skladovaného v jedné vezikule kolísá od 1 000 do 50 000 molekul a jeden motorické neuron obsahuje 300 000 i více vezikul (Lincová 2002). Uvolnění ACh z vezikul nervového zakončení je iniciováno vzruchem, který po dosažení nervového zakončení otevírá napětím řízené kalciové kanály (N-podtyp - neuronální). Influx kalcia presynapticky aktivuje řadu proteinů (synaptobrevin, synaptotagmin, SNAP atd.) asociovaných s membránou zásobních vezikul a s presynaptickou membránou (Martínková 2002). Tím je umožněno splynutí membrány vezikul se synaptickou membránou a důsledkem je synchronizované vylití obsahu určitého počtu (kvanta) vezikul do synaptické štěrbin. Množství uvolněného NT je úměrné množství kalciových iontů, které vstoupily do cytoplazmy nervového zakončení (Lincová 2002).

Po průchodu ACh synaptickou štěrbinou dochází ke kontaktu s acetylcholinovým receptorem na postsynaptické membráně. Navázáním se změjí konformace receptoru a membrána neuronu se stane propustná pro ionty, které začnou proudit do buňky a z buňky a vzniklý elektrický potenciál se dál šíří po nervovém vlákne jako elektrický impuls k další synapsi (CNS, vegetativní ganglium). Jedná-li se o membránu cílových tkání, dochází přímo k vyvolání parasymptomimetických účinků. Po rozložení acetylcholinu se receptor vrací do původního stavu (Patočka 2004a).

2.5.2 Acetylcholinové receptory:

Acetylcholinové receptory (AChRs) v CNS savců můžeme rozdělit na muskarinové a nikotinové na základě schopnosti přírodních alkaloidů, muskarinu a nikotinu, které mají na těchto receptorech stejný efekt jako ACh (Palacios 1991). AChRs také zprostředkovávají synaptickou transmissi na nervosvalové ploténce. AChRs, které vykazují rychlou excitační akci ACh, jsou nazývány nikotinové AChR (nAChR), protože mohou být aktivovány nikotinem (Patočka 2004b). nAChR se nacházejí ve vegetativních gangliích, v kosterních svalech a v mozku (Trojan 2003). AChR, které zprostředkovávají pomalou akci acetylcholinu se nazývají muskarinové AChR (mAChR), protože mohou být aktivovány muskarinem (Patočka 2004b).

nAChRs zprostředkovávají průchod draselných a sodných iontů skrz synaptickou membránu. Existují dva typy těchto receptorů: neuromuskulární nAChRs, které přenášejí signály mezi nervovou a svalovou buňkou a neuronální nAChRs, které můžeme najít v nervovém systému. nAChRs mají značnou roli v projevu ztráty nocicepce, kognitivním výkonu, modulaci postižení a zvýšením uvolňování dalších neurotransmiterů (Patočka 2004b). Tyto receptory obsahují pět

stejných podjednotek, které jsou uspořádány homopentametriky nebo pseudopentametriky, v závislosti na typu přítomných podjednotek (Le Novere 2002).

MACHRs byly poprvé definovány na základě selektivního působení agonisty muskarinu a antagonisty atropinu (Paton 1952). MACHR existuje v několika typech (M₁ – M₅), tyto typy mají tkáňově specifickou předlohu pro preskripci (Volpicelli 2004). Tyto receptory jsou přítomny v neuronech v centrálním a periferním nervovém systému, v srdečním svalu a hladkých svalech a různých exokrinních žlázách (Hirota 2001).

M₂ receptory jsou lokalizovány primárně v srdeční tkáni a jsou taky exprimovány v menším množství v hippocampu, mozkové kůře, striatu, thalamu, plicích, vas deferens a děloze (Patočka 2004b). Na periférii, mACHRs zprostředkovávají kontrakce hladkého svalu, žlázovou sekreci, a modulaci srdečního rytmu a kontraktility. V CNS zprostředkovávají motorickou kontrolu, regulaci teploty, regulaci krevního tlaku a ovlivnění paměti (Scarpeto 2003).

Při blokování AChE dochází k hromadění ACh v synaptické štěrbině a jeho nepřetržitému působení na receptorech, které jsou uloženy na postsynaptické membráně. Je tedy patrné, že dochází k celkovému ovlivnění organismu a to jak na úrovni vedení vzruchu, tak i přímým ovlivněním orgánů s parasymptickou inervací na kterých pak převládne působení parasymptiku (parasymptomimetické působení).

2.5.3 Acetylcholinesteráza:

AChE se vyskytuje přímo v synaptické štěrbině a jejím přímém okolí, dále pak na nervosvalové ploténce, v červených krvinkách a v CNS. AChE je vázaná na

buněčné struktury, především na membrány. Za normálních okolností je tento degradační enzym v nadbytku, neboť velmi rychlé ukončení působení ACh je pro organismus životně důležité. Cholinergní impulzy mohou vést k uvolnění až 1 000 „kvant“ ACh za sekundu a při nedostatečném rozkladu hrozí kumulace ACh a cholinergní krize (Lincová 2002).

Molekula AChE je tvořena dvěma peptidovými řetězci, ty se označují alfa a beta. Řetězec beta obsahuje beta-anionické místo a gama-anionické místo (oblast hydrofóbních interakcí). Aktivní místo enzymu je na alfa řetězci, skládá se z alfa-anionického místa (tvořeno karboxylem kyseliny asparagové, případně glutamové) a esterického centra v němž důležitou roli hraje aminokyselina serin (Hartl 2001). V jeho blízkosti se nacházejí ještě další aminokyseliny, histidin a glutamová kyselina. Aktivní místo je umístěno v hluboké a úzké prohlubni, na jejímž povrchu se nachází větší množství aromatických zbytků (Dougherty 1990).

Podle nejnovější teorie právě tento elektronově bohatý systém prostřednictvím kation- π interakce zajišťuje vazbu kvartérního dusíkového atomu substrátu k aktivnímu místu enzymu. Původní teorie předpokládala vazbu kvarterního dusíkového atomu substrátu k tzv. anionickému místu, tvořeného karboxylovou funkcí glutamové kyseliny (Majewski 1979).

Interakce AChE a ACh se podobá jeho interakci s receptory. K hydrolýze ACh účinkem AChE dochází tak, že se molekula substrátu přimkne k aktivnímu centru enzymu. Takto navázaný ACh se pak štěpí na cholin a zbytek kyseliny octové (acetyl). Cholin je na enzym vázán jen slabými vazbami a proto je posléze uvolněn. Acetyl se přenesse z ACh na volnou hydroxylovou skupinu, kterou obsahuje serin. Vzniká tak acetylovaná AChE, která je během zlomků sekundy reaktivována hydrolýzou na kyselinu octovou a AChE (Hartl 2001). Tato reakce probíhá velmi rychle, je to dáno řadou konformačních změn v molekule acetylované AChE. Acetylovaný enzym je

nestálý a v přítomnosti vody rychle deacetyluje, čímž se obnovuje jeho nukleofilní hydroxymethylová skupina serinu (Dougherty 1990). Jedna molekula enzymu hydrolyzuje řádově 10^5 - 10^6 molekul acetylcholinu za minutu.

AChE obsahuje kromě aktivního místa i jiná vazebná místa, tzv. allosterická, kam se mohou vázat i další ligandy. Ty nemusí mít strukturu podobnou nativnímu substrátu a k vyvolání výrazné změny enzymové aktivity stačí i velmi malé koncentrace těchto látek. Přítomnost těchto allosterických míst byla v případě AChE prokázána kinetickými studiemi i pomocí monoklonálních protilátek (Barak 1995).

Druhým degradačním enzymem je tzv. pseudocholinesteráza (cholinesteráza, též butyrylcholinesteráza: BuChE), která přednostně rozkládá jiné substráty než ACh (Lincová 2002). V lidském těle je syntetizována v mnoha tkáních, zahrnující játra, plíce, srdce a mozek (Patočka 2004b). Po dlouhou dobu byla fyziologická funkce BuChE nejasná. V nynější době již byla role BuChE dokázána, například v lipoproteinovém metabolismu (Kutty 1994), buněčné adhezi a neurogenezi (Layer 1995), v procesu vychytávání toxických molekul (Schwarz 1995), a v procesu tvorby amyloidových prekurzorových proteinů (Balasubramanian 2001).

2.5.4 Interakce AChE a NPL:

AChE může být inhibována celou řadou látek. Je-li jejich inhibiční účinek založen na nevazebných interakcích, jedná se o reverzibilní proces (např. v případě kvartérních amoniových solí včetně reaktivátorů). Některé typy sloučenin však reagují s hydroxymethylovou skupinou serinu za vzniku kovalentní vazby. Je-li vzniklý komplex stabilní, jedná se v podstatě o ireverzibilní inhibici. NPL jsou farmakologicky řazeny právě k ireverzibilním inhibitorům AChE. Tak je znemožněna hydrolyza endogenního ACh a organismus sám sebe intoxikuje. Podstatou klinického

obrazu otravy je tedy nahromadění ACh na místech jeho fyziologického účinku (Vopršalová 1996).

Nejdůležitějším místem aktivního povrchu AChE je tzv. katalytické centrum, které je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu, tzv. α -anionické místo (Bajgar 1991). Účinek organofosfátů spočívá v kovalentní vazbě fosforu na OH-skupinu molekuly serinu v esterickém centru AChE. Tato fosforylace centra odpovídá acetylaci, což je mezireakce při hydrolyze ACh. Defosforylace na rozdíl od deacetylace probíhá tak pomalu, že simuluje ireverzibilní poškození enzymu: aktivní centrum totiž už není k dispozici pro hydrolyzu ACh. ACh není „schopen“ vytěsnit zbytek kyseliny fosforečné od enzymu, organofosfáty jsou tedy ve vztahu k ACh nekompetitivní inhibitory (Lüllman 2004).

Vazba organofosfátu na AChE probíhá ve dvou fázích. V první fázi je vazba je ireverzibilní a tuto můžeme ovlivnit reaktivátorem. Rychlost přechodu na druhou, nevratnou formu (toto nazýváme „stárnutí“, anglicky „ageing“) je u jednotlivých organofosfátů různě rychlý. U některých jsou to sekundy (soman), u jiných i hodiny (Prokeš 2005). Po chemické stránce se jedná se o dealkylaci – odštěpení alkylové skupiny z komplexu inhibitor-esteráza. Rychlost stárnutí tedy závisí na alkylové skupině, která je navázaná na fosfor (Patočka 2004b).

Na molekulární úrovni je stárnutí charakterizováno rozštěpením jedné z vazeb kyslíku na fosfor, čímž dojde k zesílení vazby fosforu na enzym. Proto je tendence využívat jako insekticidy takové inhibitory cholinesterázy, které jen pomalu a z malého procenta stárnou, naproti tomu jako bojové látky vyvíjet takové sloučeniny, které stárnou obzvlášť rychle, takže po vzniku otravy není možné enzym reaktivovat (Lüllman 2004).

Fosforylovaná AChE může podlehnout spontánní hydrolyze a to vlivem volných enzymů (Vandekar 1957, Davison 1955). Spontánní znovuoobnovení aktivity

(reaktivace) inhibovaného enzymu probíhá velmi pomalu, stejně jako syntéza AChE de novo (Patočka 2004a). Trvá přibližně 50 dní, než se AChE v mozku plně regeneruje. V bezjaderných erythrocytech, které nejsou schopny syntetizovat bílkoviny, se zotaví jejich enzymová aktivita až po nahrazení otrávených buněk novými erythrocyty. Nebezpečné příznaky otravy vymizí však již v okamžiku, kdy se obnoví pouhý zlomek normální enzymové aktivity (Lüllman 2004). Spontánní regenerace je chemická reakce a tak je také závislá na množství enzymu, teplotě a pH (Patočka 2004b).

2.6 Problematika intoxikace NPL:

2.6.1 Klinický obraz akutní intoxikace:

Podstatou klinického obrazu otravy organofosfáty je nahromadění ACh na místech jeho fyziologického účinku. Podle toho, na kterých receptorech nastává nahromadění ACh a tedy nadměrný přenos vzruchů na periferii, rozdělují se klinické příznaky otravy na muskarinové, nikotinové a centrální (Vopršalová 1996). V závislosti na stupni intoxikace mohou být tyto příznaky vyjádřeny v různé míře. Příznaky muskarinového typu jsou dané akumulací ACh na synapsích vegetativního systému, příznaky nikotinové pak hromaděním ACh na neuromuskulárních ploténkách motorických nervů a v gangliích. Centrální příznaky jsou vyvolány nerovnováhou mezi cholinergním přenosem nervového vzruchu a ostatními neuromediatorovými systémy v CNS (Bajgar 1991).

Nejčasnějším projevem intoxikace je zúžení zornic (mióza) a toto je doprovázeno poruchou akomodace způsobenou znehybněním ciliárního svalu, tedy obecně zhoršeným viděním. Dalšími příznaky muskarinového typu jsou pak

překrvení a otok nosní sliznice, zvýšená činnost slinných, slzných a potních žláz. Závažné jsou příznaky v bronších a to jsou obstrukce dýchacích cest (zvýšenou sekrecí bronchiálních žlázek a zúžením bronchů), tím se prodlužuje výdech, toto může vést až k dušnosti, bolesti na hrudi či k cyanóze. Dále pak na hladké svalovině trávicího traktu (nechutenství, nausea, zvracení, křeče, průjem, tenesmy a nucená defekace) a močového měchýře, kdy se zvyšuje frekvence močení (Kassa 1993). Na srdci je v důsledku zvýšeného tonu parasymptiku pozorována bradykardie a pokles krevního tlaku (Patočka 2004a).

Nikotinové příznaky jsou charakterizovány svalovou ochablostí, třesem, záškuby jednotlivých příčně pruhovaných svalů, které se postupně rozšiřují na všechny kosterní svaly těla. Svalové fascikulace brzy přecházejí v intenzivní křeče, které mohou vyústit až v ochrnutí (paralýzu) kosterního svalstva (Patočka 2004a). Účinky na sympatických gangliích se na organismu projevují bledostí a tachykardií, což vede k přechodnému zvýšení krevního tlaku (Vopršalová 1996, Kassa 1993).

Centrální příznaky jsou charakterizovány depresiemi dechových a kardiovaskulárních center v oblasti prodloužené míchy, bolestmi hlavy, úzkostí, nadměrnou emoční labilitou, napětím, neklidem, závratěmi, depresivními stavy, zmateností, poruchami hybnosti a nezřídka i bezvědomím (Patočka 2004a).

Při nižších dávkách, které nejsou často ani klinicky diagnostikovány a nejsou patrné žádné typické klinické příznaky, jako je mióza či fascikulace, dochází k narušení kognitivních funkcí. Pokles kognitivních funkcí se vyznačuje poruchami úsudku a myšlení při cílených činnostech a při všeobecném zpracovávání informací. Zároveň bývá patrná emoční labilita, podrážděnost či apatie a změny sociálního chování. U postiženého jedince přitom není porušeno vědomí a nejsou známky deliria (Nevšimalová 2002).

Nejpodstatnější patogenetický faktor intoxikace představuje hypoxie a hyperkapnie v důsledku respirační insuficience, vyvolané blokadou cholinergního přenosu dráhy dýchacího reflexu. Zvýšená hladina ACh a porušená permeabilita membrán vede k narušení hladin iontů (sodík, draslík, vápník), což má za následek celkový rozvrat metabolismu a prohloubení nespecifikované stresové reakce organismu - zvýšení hladiny kortikosteroidů, cyklických nukleotidů aj. (Bajgar 1991).

Smrt v případě těžkých akutních otrav nastává následkem bronchospasmu nebo paralýzy příčně pruhovaného svalstva, především bránice, popřípadě u látek s výraznými centrálními účinky následkem centrálního útlumu dechu (Vopršalová 1996). Těžká dechová nedostatečnost postupně vede k zástavě dechu s následnou zástavou srdce (Patočka 2004a). Vědomí bývá obvykle dlouho zachované (Vopršalová 1996).

V průběhu otravy může být také vyčleněna tzv. „opožděná fáze akutní otravy“, je charakterizována jako období po překonání akutní respirační insuficience a z biochemického hlediska rozvojem nespecifických příznaků, které souvisejí s porušenou permeabilitou buněčných membrán, kyslíkovým hladověním tkání a značným energetickým výdejem (Bajgar 1991). Je charakterizována patologickými poruchami srdečního rytmu a respirace. Závažnou komplikací této fáze je i sekundární infekce, která se může vyvinout již druhý den po intoxikaci.

2.6.2 Pozdní neurotoxický efekt:

Pozdní neurotoxický efekt se projevuje poruchou funkce periferního i centrálního neuronu a jeho generativními změnami (degenerace axonů a následná degenerace myelinu), pravděpodobně jako důsledek změn aktivity neurotoxické esterázy (Patočka 2004a). To znamená, že neurotoxicita není podmíněna inhibicí

AChE, některé organofosfáty fosforylují jiný enzym přítomný v nervové tkáni, tzv. „neurotoxickou esterázu“, která zodpovídá za rozvoj opožděné neurotoxicity. Specifická terapie pro tuto formu neurotoxicity není známa (Vopršalová 1996). Přitom neurotoxicita se rozvíjí už při minimálních expozicích, které nezpůsobily ještě žádnou měřitelnou inhibici AChE, otrava organofosfáty tedy nemusí být klinicky diagnostikována.

Pozdní neurotoxický efekt se často manifestuje až za více dnů až týdnů po expozici, je charakterizována sensorickými poruchami: mravenčení a bolesti, které se z počátku objevují distálně v končetinách, pak stoupají a zesilují. Současně se vyvíjejí motorické poruchy, které se z počátku objevují také distálně a končí v mnoha případech paralýzou končetin (Lüllman 2004). Jde o paralýzu s minimálním postižením senzitivní inervace. Poté následuje stadium denervace a po ní se vyvíjí těžká atrofie svalů horních i dolních končetin (Patočka 2004a). Klinický obraz lze tedy označit jako polyneuropatii.

Specifická medikamentózní léčba není dosud známá. Může následovat částečná reparace, avšak období rekonvalescence bývá velmi dlouhé (Patočka 2004a). Ústup příznaků trvá měsíce i roky (Lüllman 2004). I po několika desítkách let se zjišťuje sklon k spasticitě a abnormální šlachové reflexy (Bajgar 1991).

2.7 Problematika terapie otrav NPL:

2.7.1 Nespecifická terapie otrav NPL:

Vzhledem k vysoké toxicitě organofosfátů a rychlému nástupu účinku, musí být terapie dostatečně rychlá, radikální a komplexní (Vopršalová 1996). Pro každou závažnější intoxikaci NPL je charakteristický po několikaminutové latenci

dramatický průběh provázený vážným narušením základních životních funkcí končící bez adekvátní terapie smrtí během 20 – 30 minut. Vzhledem k bezprostřednímu ohrožení života v případě závažnějších intoxikací musí být terapie zahájena co nejdříve. Proto má zásadní význam úspěšná první pomoc, která může při včasném a správném poskytnutí zachránit život otráveného a zásadně ovlivnit i další průběh otravy, včetně její prognózy (Prymula 2002).

V rámci první pomoci je třeba zabránit další absorpci inhibitoru AChE. Při průniku kůží by měl být co nejdříve odstraněn kontaminovaný oděv a exponovaná pokožka důkladně omyta mýdlem a vodou. Při vniknutí jedu do oka je třeba vypláchnout spojivkový vak a vkápnout 1 % roztok atropinu. V případě perorálních otrav se provádí velmi účinná laváž žaludku vodou a aktivním uhlím, které nespecificky váže přítomný toxin. Velmi dobře se osvědčila i eliminace toxické látky z krve hemoperfuzí (Vopršalová 1996).

V rámci AČR, by první pomoc při otravě NPL měla navíc zahrnovat podání antidot, což jsou látky specificky zabraňující toxickému účinku NPL pomocí autoinjektoru, zamezení dalšího průniku jedu do organismu a to nasazením prostředků individuální ochrany (ochranná maska) a odmořením zasažených míst pomocí individuálního protichemického balíčku, obsahujícího k tomuto účelu Desprach. Včasné odmoření může zabránit vzniku otravy, nebo podstatně zmírnit její rozvoj (Kassa 1993).

2.7.2 Funkční antidota v terapii otravy NPL:

Anticholinergika (funkční antidota) zabraňují nadměrné stimulaci AChRs tím, že brání navázání nahromaděného ACh na tyto receptory (Prymula 2002). Z anticholinergik je běžně podáván jen atropin, který antagonizuje periferní

muskarinové příznaky, poměrně málo centrální (neboť obtížně prochází přes hematoencefalickou bariéru) a prakticky neovlivňuje nikotinové (Bajgar 1991). Toto antidotum se podává s cílem antagonizovat salivaci, bronchiální sekreci a bronchokonstrikci, zatímco kosterní svalstvo (včetně svalů respiračních) zůstávají neovlivněny a tedy paralyzovány (Vopršalová 1996). Podává se i.v. nebo intramuskulárně (i.m.) v úvodní dávce 2 – 5 mg (u dětí 0,5 – 2,0 mg podle věku) a podle tíže otravy se jeho podání opakuje v 10 – 30 minutových intervalech až do mírné atropinizace pacienta (rozšíření zornic – mydriáza, suchost sliznic, tachykardie, zčervenání kůže) (Bajgar 1991).

Pokud je to možné, je výhodné podávat atropin v infuzi. Tolerance organismu intoxikovaného NPL je vůči atropinu tak vysoká, že prakticky není možné intoxikovaného jedince atropinem předávkovat (Patočka 2004). V extrémních případech je možno podat až 4 000 mg v infuzi za 1 den (Lüllman 2004). U léčby atropinem je nebezpečí vzniku fibrilace komor při velké hypoxii. Proto je nutné při podání vysokých dávek atropinu zabezpečit i oxygenoterapii (Bajgar 1991).

U těžkých intoxikací je možné doplnit atropinizaci podáváním jiných anticholinergik které mají silnější centrální účinky, a to zvláště u intoxikací NPL s převahou centrálních účinků (soman, sarin). V AČR je zaveden jako druhé anticholinergikum vedle atropinu benaktyzin (Prymula 2002). Benaktyzin se podává p.o. a to v dávce (3 – 5 mg denně), navíc také příznivě ovlivňuje křečovou složku otravy. Z dalších anticholinergik byla experimentálně zkoušena řada látek, mnoho z nich nedosáhlo širšího uplatnění a jen některá byla klinicky zkoušena (Bajgar 1991). Jako další vhodná anticholinergika s převahou centrálního účinku se jeví biperiden a skopolamin (Patočka 2004a).

2.7.3 Kauzální antidota v terapii otravy NPL:

Reaktivátory AChE (kauzální antidota) jsou sloučeniny, kterým se daří znovu reaktivovat již intoxikovanou AChE, nikoli však nespecifickou sérovou cholinesterázu (Lüllman 2004). Myšlenka, že jisté sloučeniny mohou značně urychlit spontánní regeneraci fosforylované AChE je spojována s Wilsnovým experimentem s hydroxylaminem a cholinem (Wilson 1951).

Hydroxylamin potvrdil hypotézu, že je nezbytné najít sloučeniny se zlepšenými nukleofilními vlastnostmi, zatímco cholin potvrdil teorii, že kvarterní dusík může zesílit nukleofilní atak (Wilson 1955). K tomuto účelu jsou tedy vhodné sloučeniny, které mají nukleofilitu vyšší než voda, např. hydroxylamin, hydroxamové kyseliny a oximy (Hartl 2001). Terapeutický potenciál takovýchto látek stimuloval výzkum, který vyvrcholil objevením pralidoximu Wilsonem a Ginsburgem (Wilson 1955) a také Childsem a kolektivem (Childs 1955). V dnešní době je známo několik set takovýchto sloučenin, byly pojmenovány jako reaktivátory fosforylované AChE (Kassa 2002).

Míra reaktivace závisí na délce kontaktu inhibitoru s AChE a dále na chemických vlastnostech příslušného esteru kyseliny fosforečné (Lüllman 2004). Obecně platí, že reaktivační účinnosti oximů jsou poměrně omezeny, přičemž hlavní příčinou je rychlost stárnutí inhibovaného enzymu, proto musí být podány dostatečně brzy, nejlépe v prvních minutách po intoxikaci. Jakmile komplex enzym-organofosfát zestárne, nejsou oximy schopny enzym reaktivovat.

Mechanismus působení oximů je založen na znalosti, že organofosfát má vyšší afinitu k oximům než k AChE. Oximová skupina je vysoce nukleofilní, reaguje s fosfátem inaktivovaného enzymu, vzniká komplex oxim-organofosfát a AChE se uvolňuje. Účinek oximů nastupuje velmi rychle, aktivita motorických nervů se

obnovuje po i.v. podání za několik minut. Méně výrazně než na nervosvalovém spojení se účinek oximů projevuje na efektorových místech parasymptiku, a v CNS je jejich účinek pouze nevýznamný (Lincová 2002).

Oximy jsou syntetické látky, které obsahují vysoce nukleofilní skupinu R-CH=N-OH. Nejvýznamnější představitelé jsou trimedoxim a pralidoxim, tyto látky však ve své molekule obsahují kvarterní dusík, a proto prakticky neprostupují do CNS (Lincová 2002). Pralidoxim je zástupcem monokvarterních oximů, výhodnější vlastnosti má trimedoxim, který je řazen do skupiny biskvarterních oximů, které vzhledem ke své struktuře mohou reagovat se dvěma anionickými centry enzymu a jsou také lipofilnější, takže lépe procházejí hematoencefalickou bariérou (Hartl 2001). Stejně tak je ve světě znám a používán obidoxim, vyráběný pod názvem Toxogonin®. Zlepšení průchodu přes hematoencefalickou bariéru je jeden z nejdůležitějších důvodů k syntéze a zkoušení nových typů oximů. Tyto látky mají pak také vyšší účinnost v reaktivaci AChE na nervosvalové ploténce (Vopršalová 1996).

Také poměrně nízká reaktivační účinnost výše uvedených reaktivátorů AChE vedla k pátrání po nových, účinnějších oximech, z nichž oxim označovaný jako HI – 6 se dočkal na základě experimentálních výsledků také klinických zkoušek a zavedení do léčebné praxe (Patočka 2004a). Další ze známých látek je diacetylmonoxim, který prochází přes hematoencefalickou bariéru a zřejmě také regeneruje cholinesterázu v CNS (Vopršalová 1996).

2.7.4 Další možnosti doplnění terapie:

Další terapie pak zahrnuje přerušování centrálně vyvolaných křečí tlumícími látkami, například diazepamem, který je zároveň lékem první volby. Zvláště při

použití periferně působícího anticholinergika atropinu je doplnění antidotní terapie o antikonvulzivum považováno za velmi důležité. Současně se uvažuje také o použití alprazolamu nebo klonazepamu (Prymula 2002). Také je důležité potlačení acidózy podáváním pufovacího roztoku NaHCO_3 (Lüllman 2004). Občas je nutností léčit symptomatickou silnou bronchiální sekreci, farmakologicky podpořit dýchání (Syntophyllin) a nebo také zavést řízené dýchání nebo oxygenoterapii.

Preventivně lze někdy podávat karbamát. Nejdéle známým a nejčastěji užívaným inhibitorem AChE karbamátového typu je přírodní alkaloid Physostigmin. Mechanismus účinku je dán schopností vázat se na AChE, kdy vzniklý komplex se po určité době štěpí a AChE tak regeneruje.

Jako zatím nejlepší preventivní prostředek se ukazuje preparát PANPAL vyvinutý ve VLA JEP Hradec Králové (Prokeš 2005), jehož další nezanedbatelnou výhodou je využití v případě nehod a katastrof. Toto antidotum je tvořeno dvěma tabletami, kdy tableta A obsahuje jako účinné látky benactizini hydrochloridum a trihexylphenidoli hydrochloridum. Účinná složka tablety B je pyridostigmini bromidum. Tento komplexně působící preparát má účinek zachován nejméně po dobu 8 hodin a nemá významné vedlejší ani nežádoucí účinky (Brabec 2000). V klinických zkouškách je i náplast pro perkutánní aplikaci, Transant (Prokeš 2005).

3 MATERIÁL A METODY:

3.1 Zvířata:

Jako pokusná zvířata v našem experimentu byli použiti albinotičtí samci potkanů kmene Wistar, zvířata byla zakoupena z chovu v Konárovicích (Česká Republika). Jejich hmotnost byla v rozpětí 200 – 220 gramů.

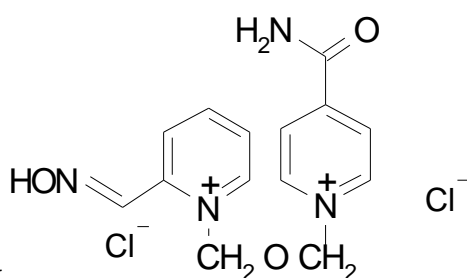
Zvířata byla držena ve standardních podmínkách (tj. při $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a $50 \pm 10\%$ relativní vlhkosti, ve dvanáctihodinovém intervalu světlo – tma). Pokusná zvířata byla krmena standardní Larsenovou dietou a voda byla podávána ad libidum.⁽⁵⁵⁾ Zvířata byla rozdělena do skupin po osmi.

Experiment byl schválen Odbornou komisí Vojenské lékařské akademie a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci králové v souladu s vyhláškou 207/2004 Sb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Personál manipulující se zvířaty byl předem proškolen a obdržel osvědčení o způsobilosti pracovat s laboratorními zvířaty podle § 17 odstavce 1 zákona.

3.2 Chemikálie:

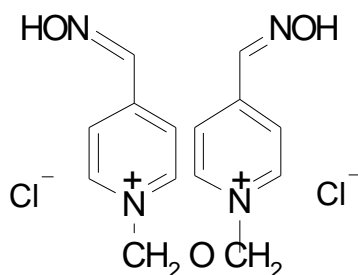
Tabun (GA: O – ethyl –N,N-dimethylamidokyamofosfát, viz. Tab. č. 1) o čistotě 89 % byl získán z Vojenského Technického institutu v Brně (Česká Republika). Tato čistota byla kvantitativně zjištěna pomocí acidometrické titrace.

Zkratkou HI-6 (Obr. č. 2) se označuje 1-[[[4-(aminokarbonyl)pyridinio]methoxy]methyl]- 2-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium-dichlorid. Jedná se obecně o nejlepší antidotum proti NPL v humánní medicíně, jeho účinnost je nedostatečná pouze u tabunu. V tomto pokuse je použit jako standard při testování nových potenciálních reaktivátorů.



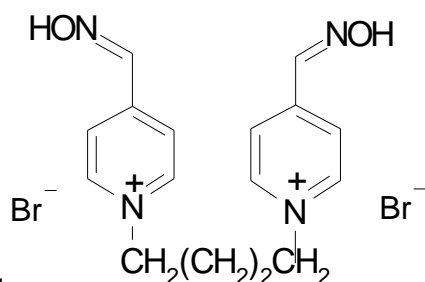
Obr. 2: HI - 6

Obidoxim (Obr. č. 3) je generický název pro 1,1'-oxydimethylen-bis[4-(hydroxyiminomethyl)pyridinium]-dichlorid. Je použit také jako standard, protože jeho terapeutický účinek vůči intoxikaci tabunem je ze všech známých oximů nejlepší.



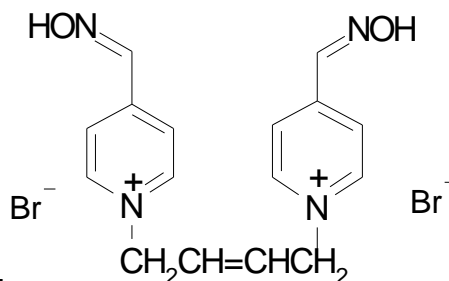
Obr. 3: Obidoxim

KO74 (Obr. č. 4) je generický název pro 1,4-bis(4-hydroxyimino-methylpyridinium)butane dibromid. Tento oxim je nově syntetizovaná látka na základě znalosti nejvíce účinných chemických struktur vůči intoxikaci tabunem.



Obr. 4: KO74

KO75 je generický název pro sloučeninu (E)-1,4-bis(4-hydroxyimino-methylpyridinium)but-2-en dibromid. Jedná se též o nově syntetizovanou látku.



Obr. 5: KO75

Oximy byly syntetizovány na Katedře Toxikologie, Fakulty Vojenského zdravotnictví v Hradci Králové a jejich čistota byla 98 %. Čistota byla analyzována za užití HPLC.

3.3 Metodika:

3.3.1 Funkční pozorovací baterie:

NPL, tedy tabun použitý v tomto pokusu působí na organismus neurotoxicky, může způsobit reverzibilní či ireverzibilní poškození centrálního nebo periferního nervového systému. Projevy narušené funkce nervového systému se dají zaznamenat na několika úrovních – od buňky až po organismus jako celek. Nejnápadnějším ukazatelem neurotoxicity je behaviorální dysfunkce organismu (Abou-Donia 1992).

Existuje mnoho metod kterými lze neurotoxicitu hodnotit. Funkční pozorovací baterie je zpravidla série neinvazivních hodnocení a interaktivních posuzování neurobehaviorální a funkční integrity živočichů (Moser 1988, Tilson 1992). Testování pomocí Funkční pozorovací baterie by mělo představovat postupný přechod od nejméně interaktivních měření po více interaktivní. Měření by mělo být

zakončeno nejinvazivnějšími postupy, mezi něž je řazena citlovost vůči bolesti a měření teploty (Jacobson-Kram 2001).

Funkční pozorovací baterie zahrnuje celou škálu metod umožňující testovat motorické, senzitivní a autonomní nervové funkce (Frantík 1995). Metody jsou děleny do čtyř skupin, z nichž většina je hodnocena podle standardně používaných škál. Absolutní hodnoty parametrů Funkční pozorovací baterie jsou zaznamenávány v přehledné souhrnné tabulce (Tabulka 5).

Pozorování v kleci:

Tímto pozorováním je zahájeno vlastní testování zvířete, jedná se o absolutně neinvazivní postup, kdy není zvíře pod přímým vlivem přítomnosti pozorovatele. Zde se zaměřujeme na polohu a chování zvířete v kleci kdy pouze první tři hodnoty (1, 2, 3) jsou hodnoceny jako normální. Ačkoli se v literatuře běžně uvádí, že hodnocení piloerekce probíhá během handlingu (Jacobson-Kram 2001), na základě našich zkušeností jsme prováděli pozorování piloerekce již při neinvazivním pozorování zvířete v kleci, jelikož při handlingu dochází k ovlivnění vzhledu srsti rukou hodnotící osoby i reakcí samotného zvířete na handling (Kunešová 2005).

Posuzování při manipulaci:

Po dokončení první části pozorování je zvíře vyjmuto z klece, pozornost je zaměřena na reakce zvířete na snadnost vyjímání stejně jako manipulační zacházení (handling). Zvíře se vždy bere za trup, nikoli za ocas. Následuje orientační klinické vyšetření, zahrnující vyhodnocení svalového tonu, stavu lakrimace, stupně otevření očí, polohy očního bulbu v orbitě, vzhledu spojivky, salivace, přítomnosti nosního sekretu a teploty, barvy a vzhledu kůže.

Pozorování ve volném poli:

Zvíře se umístí do středu podložky, která je položena na rovném ohraničeném prostoru a pozoruje se po dobu tří minut. Hodnotí se přítomnost hyperkinézy, tremoru, tonických a klonických křečí, také chůze a celková pohyblivost zvířete. Pokud se zvíře během tří minut nepohne, jemně jej postrčíme, pokud ani pak nejeví známky aktivity, charakterizujeme chůzi jako shrbenou nebo vláčení těla podle stavu končetin. Dále se hodnotí také další parametry jako dýchání, tenze, projevy vokalizace, přítomnost poruchy hybnosti (ataxie) a obrny (parézy), stereotypie (přirozené chování v masivním výskytu jako je kroužení, čichání a kývání se) a bizardního chování, což je charakterizováno jako jakékoliv chování, které obvykle nepozorujeme a jeví se nám jako nepřirozené.

Nakonec se u zvířete hodnotí úroveň spontánní aktivity, vztyčování čili vertikální explorace (zaznamenává se počet vzpřímů za tři minuty, vzpřímem se rozumí úplné zdvihnutí předních končetin a to s podporou nebo bez podpory), míra urinace (zaznamenává se počet loužiček za tři minuty, nelze-li je spočítat zapisuje se hodnota 10) a defekace (zaznamenává se počet bobků za tři minuty).

Hodnocení reakcí na podněty:

V této fázi hodnotíme reakce pokusného zvířete na vnější podněty. Reakce na přiblížení je prováděno pomocí tupého předmětu, který přiblížíme asi tři centimetry od čenichu v horizontální rovině a držíme jej pět sekund před zvířetem. Reakci na dotyk hodnotíme na základě jemného dotyku tupým předmětem na boku po dobu jedné sekundy. Reakci na akustický podnět zjišťujeme neočekávaným klapnutím předmětem asi pět centimetrů nad zátylkem.

Hodnocení reakce na bolestivý podnět se doporučuje provádět až nakonec pozorování, jelikož se jedná o invazivní měření, které by mohlo ovlivnit další

pozorované hodnoty. Kovovou pinzetou se krátce zmáčkne ocas zvířete 2 – 3 centimetry od konce. Také hodnotíme velikost zornic za standardních světelných podmínek a jejich reakce na náhlý paprsek světla.

Součástí Funkční pozorovací baterie je také air righting reflex test, který hodnotí dopad pokusného zvířete ze zádové polohy (zvíře otočené zády k podkladu se pustí z výšky třiceti centimetrů, hodnotí se poloha při dopadu, kdy jako normální hodnota je chápán dopad na všechny čtyři končetiny). Při velmi silném postižení pohyblivosti zvířete se test dopadu neprovádí a hodnotí se pouze schopnost zvířete otočit se zpět do základní polohy poté, co je jemně položeno na záda (Kunešová 2005). Hodnocen je také dopad z vertikální polohy (zvíře se pouští ze stejné výšky, ale je ve svislé poloze – hlava nahoře a pánevní končetiny dole). Následuje hodnocení vzdálenosti stop při dopadu (rozteč při dopadu), výstupek nad čtvrtým prstem zadního chodidla se natře netoxickou barvou, zvíře se drží za hřbet a kořen ocasu končetinami dolů a pustí se z výšky třiceti centimetrů. Změříme vzdálenosti mezi středy stop, toto opakujeme dvakrát a za výslednou hodnotu je brán průměr z těchto dvou měření.

Další hodnocené parametry:

Po skončení hodnocení reakcí na podnět se u pokusného zvířete měří síla úchopu hrudních a pánevních končetin. K tomuto měření používáme siloměr, ten je napojen na mřížku, která usnadňuje uchopení zvířetem. Zvíře ležící na předloktí vyšetřovatelovy ruky se přenými končetinami zachytne mřížky a rychle odtáhne. Při měření síly zadních končetin se zvíře drží za trup, tak aby se prsty zadních končetin zachytily mřížky a rychle se zatáhne. Naměřená hodnota je přepočtena na jednotku hmotnosti. Tyto měření provádíme vždy dvakrát a z naměřených hodnot vždy vybíráme pro další statistické hodnocení tu vyšší. Nakonec se měří síla všech čtyř

končetin najednou. Mezi další hodnocené parametry v této části patří vážení zvířete (zjišťování hmotnosti) s přesností na jeden gram a tělesná teplota v rektu (konec teploměru se potře vazelínou nebo olejem, zasune se do konečníku a vyčká se na ustálení teploty).

Úplně závěrečným hodnocením je spontánní vertikální a horizontální aktivita. Zvíře se umístí do boxu Animexu (konstruován v dílnách Vojenské lékařské akademie JEP v Hradci Králové), kde je po dobu deseti minut zaznamenávána jeho motorická aktivita pomocí infračervených čidel. Součtem vertikálních a horizontálních pohybů zvířete zjistíme jeho celkovou motorickou aktivitu, kterou také statisticky hodnotíme.

Tabulka 5: Funční pozorovací baterie:

Parametr	Pouze veličiny diskrétní									
	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7
Poloha v kleci				sedí/stojí	explorální aktivita	spí/leží	atonie	boční poloha	přikrčený	pokles hlavy
Obtížnost manipulace				pasivní	normální	zvýšená reakce	pohyb	útěk	agrese	
Svalový tonus	atonie	hypotonie	normální	hypertonie	rigidita	fascikulace				
Slzení			normální	mírné	silné	krusty	krusty zbarvené			
Postavení víček				otevřená	mírně přivřená	zpola přivřená	zavřená	ptóza		
Endo / exoftalmus		endo	normální	exo						
Srst			normální	zbarvená	rozcuchaná	zbarvená, rozcuchaná	lysina	poranění	jiné změny	piloerectio
Kůže			normální	bledá	zarudlá	cyanotická	pigmentace	studená	poraněná	
Salivace			normální	mírná	silná					
Nosní sekret			normální	mírný	silný	zbarvený				
Klonické jevy			žádné	záškuby	nerytmičkový pohyb	slabý třes	silný třes	myoklonie	křeč	otřepávání
Tonické jevy			žádné	externí rigidita	opistotonus	emprostotonus	prudké skoky	křeč		
Chůze			normální	ataxie	postižení pánevních končetin	prostrace	postižení hrudních končetin	chůze po špičkách	shrbená chůze	vláčí tělo
Skóre postižení chůze				žádné	mírně abnormální	zřetelně abnormální	značně abnormální			
Skóre pohyblivosti				normální	mírně snížená	zřetelně snížená	zcela nepohyblivá			
Aktivita				velmi nízká	občasná	snížená	normální	zvýšená	trvalá	
Tenze			žádná	místní (uši)	stupor					
Stereotypie			žádná	hlava	trup	čištění	běh	jiné		
Bizardní chování			žádné	hlava	trup	automutilace	abnormální pohyb	jiné		
Reakce na přiblížení				žádná	normální	zvýšená	energická	prudká		
Reakce na dotyk				žádná	normální	zvýšená	energická	prudká		
Reakce na zvuk				žádná	normální	zvýšená	energická	prudká		
Reakce na bolest				žádná	normální	zvýšená	energická	prudká		
Velikost zornic	mióza značná	mióza mírná	normální	mydriáza mírná	mydriáza značná					
Reakce na světlo			žádná	normální						
Dopad				normální	ataktický	bok	záda	vzpřím ze ZP	stimul v ZP +	stimul v ZP -

3.3.2 Vlastní provedení pokusu:

Většina parametrů je hodnocena subjektivně osobou provádějící pokus, proto prováděla všechna testování pouze jedna osoba s dostatečnou praxí. Tato osoba hodnotila parametry naslepo, což znamená, že nebyla obeznámena s dávkováním látek u jednotlivých skupin zvířat.

Účinnost vybraných reaktivátorů AChE byla hodnocena *in vivo*, Funkční pozorovací baterií, a to 24 hodin a 7 dní po intoxikaci tabunem. Zvířata byla intramuskulárně intoxikována střední letální dávkou tabunu (látka GA, $180 \mu\text{g.kg}^{-1}$ – 1 LD_{50}). Přesná hodnota LD_{50} tabunu byla před tímto experimentem aktuálně stanovena. Jako terapie intoxikovaných zvířat byly použity reaktivátory AchE oximového typu, které byly i.m. aplikovány 1 minutu po intoxikaci: HI – 6, obidoxim, KO74 a KO75.

Zvolené dávky reaktivátorů byly navzájem ekvimolární, HI – 6 (39 mg.kg^{-1}), obidoximu ($10,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), KO74 ($2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) a KO75 ($3,6 \text{ mg.kg}^{-1}$). Kombinovány byly s v terapii běžně užívanou anticholinergní látkou atropinem v dávce 21 mg.kg^{-1} . Hodnoty testovaných parametrů tabunem navozené neurotoxicity u experimentálních zvířat byly porovnávány vzhledem ke kontrolní skupině, kde byl místo tabunu a antidota i.m. aplikován pouze fyziologický roztok.

3.3.3 Statistické hodnocení:

Data získaná hodnocením parametrů Funkční pozorovací baterie zahrnují kategorické, ordinální a kontinuální hodnoty. Statistické analýzy byly provedeny pomocí speciálního počítačového interaktivního programu NTX (Frantík 1995). Z kategorických a ordinárních hodnot byly poté vypracovány kontingenční tabulky, které byly dále hodnoceny Chi-kvadrát testem homogenity, Concorgance-

Disconcordance testem a Kruskal-Wallis testem. Kontinuální data byla zpracována pomocí statistických testů: CI for Delta, Bartlettův test, Williamsův test a Testem pro distribuční funkce. Zjištěné rozdíly hodnot byly posuzovány jako statisticky významné, pokud dosáhly alespoň hodnoty $p < 0,05$ (Tabulka 6).

Tabulka 6: Hodnoty statistické významnosti:

x < 0,05	*
x < 0,01	**
x < 0,005	***

4 VÝSLEDKY:

Výsledná data získaná hodnocení tabunem navozené neurotoxicity 24 hodin a 7 dní po intoxikaci jsou zanesena do tabulek číslo 7 a 8. Dva neléčení, tabunem intoxikovaní potkani uhynuli během prvních 24 hodin. Všichni potkani kteří byli léčení kompletní antidotní terapií, která obsahovala kombinaci anticholinergní látky a reaktivátoru AChE přežili až do konce pokusu trvajícího 7 dní.

4.1 Hodnocení experimentu po 24 hodinách:

Funkční pozorovací baterie obsahovala celkem 47 parametrů pro hodnocení motorických, senzorických a autonomních nervových funkcí. Hodnocení parametrů provedené 24 hodin po intoxikaci prokázalo 29 statisticky významných neurotoxických znaků u skupiny zvířat intoxikované tabunem, které nebyla podána terapie (Tab.č. 7). U všech skupin jimž byla podána terapie došlo ke snížení počtu znaků navozené neurotoxicity bez ohledu na složení antidotní terapie, u žádné však nedošlo k naprosté eliminaci nežádoucích symptomů navozené toxicity.

Výsledky prokázaly, že jednotlivé kombinace reaktivátorů AChE s atropinem jsou po intoxikaci navozené tabunem rozdílně účinné. Velmi účinnou látkou se nám jevil oxim KO75, jedná se o novou látku, která byla syntetizována na Katedře toxikologie FVZ. Jeho účinek byl lepší i ve srovnání s obidoximem, který je považován za nejlepší z dosud známých oximů pro terapii tabunem navozené intoxikace.

Pasivní chování se významně projevilo ve skupině intoxikované tabunem bez následné terapie, pasivita jedinců byla zaznamenána i při manipulaci, kdy byl celkový patologický obraz zvířat zvýrazněn nízkým tonusem kosterního svalstva.

Pohyblivost a aktivita byla u této skupiny také snížena, což se také potvrdilo výrazným snížením explorativního vztyčování se ve volném poli, které bylo hodnoceno po dobu 3 minut. Veškerá reaktivita sledovaných zvířat, a to na dotyk, přiblížení, zvuk i bolest byly také výrazně negativně ovlivněny. Dále bylo zaznamenáno slzení a zvýšená nosní sekrece. Toxický účinek tabunu se projevil i na omezené úchopové síle hrudních a pánevních končetin, na zaznamenané hodnotě rozteče při doskoku a na dopadu, kdy zvířata dopadala nejčastěji na bok. Statisticky významně nižší byly hodnoty také horizontální i vertikální motorické aktivity a rektální teploty.

Ve skupinách, kde byl podán obidoxim nebo KO75, byly prokazatelně méně negativně ovlivněny některé z námi sledovaných parametrů vzhledem k otrávené skupině bez terapie. Mezi tyto parametry patřily zejména obtížnost odchyty z klece, manipulace se zvířetem a svalový tonus, ale síla končetin byla negativně ovlivněna. Statisticky snížena však zůstala vertikální a horizontální aktivita a rektální teplota. Nosní sekrece a slzení bylo také nebylo zaznamenáno. Neovlivněna zůstala také pohyblivost a také postižení chůze nebylo u těchto skupin statisticky významně změněno. Reaktivita zvířat na jednotlivé podněty zůstala naprosto normální. Byl zaznamenán snížený příjem potravy u jednotlivých jedinců, ale jejich tělesná hmotnost nebyla v té době ještě tímto faktorem statisticky významně ovlivněna.

Významné u skupiny, které byla podána látka KO75, bylo i normalizování počtů vzpřímů které svědčilo o lepší svalové síle a zájmu zvířat o nové prostředí, také aktivita, sice občasná, u této skupiny byla zachována. Velikost zornic byla normální, projevila se však jejich zpomalená reakce na světlo.

Porovnáme-li výsledky skupiny, kde byl terapeuticky podán obidoxim se skupinou, kde byla podána KO75 byly zjištěny jen malé rozdíly v terapeutické

účinnosti. Jediným rozdílem mezi těmito skupinami byla přítomnost či nepřítomnost mírného lokálního třesu.

Další nově syntetizovaná látka, KO74, která byla v našem experimentu testována neměla tak dobrou účinnost v porovnání s obidoximem nebo KO75. Některé ze sledovaných parametrů byly sice terapií pozitivně ovlivněny, ale mnoho jich zůstalo statisticky významně odlišných od kontrolní skupiny.

Jako nejhorší ze zkoušených kombinací se nám jevila terapie obsahující atropin s HI – 6. V této skupině bylo nejméně pozitivně ovlivněných parametrů. Mnoho z těchto výsledků odpovídalo výsledkům skupiny, které byl podán tabun bez terapeutického zásahu.

4.2 Hodnocení experimentu po 7 dnech:

Z projevů neurotoxicity u tabunem intoxikovaných, neléčených zvířat byly sedmý den po intoxikaci tabunem patrné: snížený svalový tonus, pasivní chování jedinců v kleci a zároveň v průběhu manipulace. Další parametry, které zůstaly statisticky významně odlišné, byly záškuby čelistí či přežvykování, zvířata nereagovala na dotyk a jejich aktivita byla i nadále velmi nízká. Postiženy rovněž zůstaly oči, u nichž převládala mírná mióza a reakce na světlo i nadále zůstala zpomalená. Statisticky významně snížená zůstala také síla hrudních i pánevních končetin, vertikální a horizontální aktivita a rektální teplota (Tab. 8).

U skupiny již byla jako terapie podán atropin s KO75 byla zaznamenána významná eliminace mnoha ze zaznamenaných projevů tabunem navozené neurotoxicity. U těchto zvířat byla statisticky snížená aktivita ve volném poli a síla úchopu dolních končetin, rovněž rozteč zadních končetin při dopadu byla významně

změněna. Na rozdíl od ostatních skupin zůstala navzdory snížené aktivitě zachována dostatečná vertikální explorace.

Skupina léčená atropinem v kombinaci s obidoximem vykazovala také velmi dobré terapeutické výsledky. Byla zde ale také zaznamenána statisticky významně snižena aktivita a zároveň byla snižena vertikální explorace. Z dalších námi hodnocených parametrů došlo k významné odlišnosti od kontrolní skupiny v rozteči při dopadu a síle úchopu horních končetin, která byla mírně snižena.

Po podání atropinu a KO74 jako terapie bylo také zaznamenáno výrazné zlepšení oproti skupině bez terapeutického zásahu. Na rozdíl od předešlých skupin jsme zde navíc zaznamenali ještě další postižení na úrovni očí, a to zpomalené reakce na světlo a mírné mydriázy. Naproti tomu u této skupiny zůstaly zachovány normální hodnoty rozteče při dopadu a rovněž síly úchopu horních i dolních končetin.

Jako nejhorší z námi podaných terapeutických kombinací se nám jeví atropin s HI – 6, kdy zůstalo mnoho námi hodnocených parametrů statisticky významně odlišných od kontrolní skupiny. U těchto jedinců zůstala i po uplynutí sedmi dní zachována pasivita v kleci, při vyjímání a práci se zvířaty, která byla podpořena sníženým tonem svalstva. Toto bylo dále potvrzeno také snížením explorační aktivity a snížením aktivity ve volném poli. Zároveň zůstala snižena reaktivita zvířat na dotyk a zvuk. Statisticky významně byla snižena také síla končetin a to jak hrudních, tak i pánevních, rozteč při dopadu a rektální teplota. Také reakce na světlo byly sníženy a byla potvrzena velmi silná mióza.

5 DISKUSE:

V této práci byla pro hodnocení neurotoxického účinku navozeného tabunem použita metoda Funkční pozorovací baterie, která obsahuje celkem 47 parametrů, které můžeme dále statisticky hodnotit. V této metodice je sdruženo hodnocení parametrů senzorických, motorických a autonomních nervových funkcí. Jedná se o velmi komplexní a jednoduché hodnocení účinků látek na přirozené chování živočichů, které nám může mnoho vypovědět o funkci jednotlivých úrovní nervového systému.

Výhoda tohoto testování spočívá v tom, že je prováděno na naivních zvířatech. Na druhou stranu jsou ovšem některé parametry obtížněji kvalifikovány a stěžejní podmínkou validity metody je vysoká zkušenost osoby, která pokus provádí (Bureš 1976).

V literatuře bývá často také diskutována otázka, zde je potkan vhodný animální model pro testování účinků organofosfátů. Abou-Donia (2003) uvádí, že ačkoli jsou potkani citliví vůči mnoha toxickým chemickým látkám, nevykazují zřetelné známky otravy organofosfáty. Naproti tomu jiní autoři považují potkany za standardní a vhodné modely pro všechny toxikologické studie včetně akutních, multidávkových, vývojových, reprodukčních, karcinogenních a neurotoxických (Jacobson-Kram 2001).

Výsledná data, zanesená v tabulkách 7 a 8 prokazují vysokou citlivost laboratorních potkanů na intoxikaci NPL, v tomto případě tabunu. Ve skupině, které nebyla podána antidotní terapie, bylo mnoho pozorovaných parametrů statisticky významně změněno vzhledem ke kontrolní skupině. Rovněž s přihlédnutím k samotné metodě Funkční pozorovací baterie je potkan s jeho typickými

fenotypovými vlastnostmi považován za optimální model ve srovnání s jinými druhy běžně laboratorně používaných hlodavců jako jsou morčata nebo myši (Kunešová 2005). Za velmi výhodné vlastnosti pro toto hodnocení považujeme zejména jejich snadné přivykání na handling, vysokou explorální aktivitu a anatomickou způsobilost.

Nejspolehlivějších výsledků je dosaženo, jestliže jsou zvířata předem po několik dní handlována, aniž by byla vystavena bolestivým nebo jinak nepříjemným podnětům (Bureš 1976). Zvířata tak mají dostatek času zvyknout si na dotyk ruky examinatora a jeho pach, proto byla zvířata v tomto pokusu takto připravována již několik dní před vlastním zahájením experimentu.

Funkční pozorovací baterií byly již v minulosti testovány organofosforové inhibitory AChE na několika na sobě nezávislých pracovištích. Jako hlavní ukazatele neurotoxicity byly uvedeny: tremor, mióza, svalová slabost, snížená motorická aktivita, snížená citlivost na bolest a zvýšená excitabilita, v polovině případů byly ovlivněny sensorimotorické parametry, někdy zvýšená rozteč při dopadu. Z autonomních parametrů byla nejméně často pozorovaná lakrimace (Moser 1995). V dalších pracích pak byla publikována doplňující data, která byla dána ovlivněním cholinergního systému, a to snížená reakce na bolest (Koehn 1978), přežvykování (Salamone 1990) a hypotermie (Gordon 1994).

Tyto údaje by potvrzeny i v naší studii. V průběhu pokusu byla zvířata zařazená do skupiny intoxikované tabunem bez následné terapie pasivní a měla statisticky významně sníženou aktivitu, a to jak při pohybu ve volném poli po dobu 3 minut, tak i v průběhu měření horizontální a vertikální aktivity Animexem po dobu 10 minut.

Toto bylo také podpořeno snížením svalového tonu, kdy zvířata vykazovala hypotonii až atonii. Rozteč při dopadu byla signifikantně snižena, a to i u skupin,

kterým byla podána kombinovaná terapie, a k úpravě tohoto parametru nedošlo u většiny skupin ani po uplynutí sedmi dní od podání tabunu.

V souladu s dříve publikovanými pracemi na dané téma byla u neléčené skupiny zaznamenána silná lakrimace, snížení rektální teploty a významné ovlivnění všech reaktivních parametrů (reakce na přiblížení, na dotyk, na zvuk a bolest). Potvrzena byla také mióza, která byla velmi výrazná a po sedmi dnech nebyla stále úplně eliminována, i když došlo k jisté úpravě stavu. Zornice zvířat po 24 hodinách nereagovaly na přiblížení světelného zdroje, po sedmi dnech již byla patrná zpomalená reakce. Záškuby čelistí, přežvykování, bylo pozorováno až po sedmi dnech.

Tremor nebyl u testovaných jedinců přítomen po celou dobu pokusu, pouze při zjišťování výsledků po 24 hodinách. V našem pokuse byla navíc zaznamenána nosní sekrece po 24 hodinách, k úpravě tohoto parametru došlo v průběhu dalších dní, takže při opakovaném měření po sedmi dnech již nebyla zjištěna.

Pryor et al. (1983) uvádí, že neurotoxické látky snižují sílu úchopu více u pánevních končetin než u hrudních, což autor vysvětluje patologickou progresí otravy NPL. Na základě námi zjištěných výsledků, uvedených v tab. 7 a 8, nemůžeme tento názor jednoznačně potvrdit. U skupiny, které byla podána dávka tabunu bez následné terapie, došlo k významnému snížení hodnot síly úchopu u pánevních i hrudních končetin a k úpravě těchto hodnot nedošlo ani po uplynutí sedmi dní.

Po 24 hodinách došlo ke zlepšení síly úchopu na úrovni pánevních končetin u skupin, kterým byly podány oximy: KO75 a HI – 6. Po sedmi dnech však u látky KO75 byla zjištěna statisticky významné snížení síly úchopu u pánevních končetin, a u oximu HI – 6 byly sníženy obě hodnoty. U obidoximu a KO74 byly po 24 hodinách tyto hodnoty výrazně sníženy, ale po sedmi dnech došlo u KO74 k úpravě obou

hodnot a u obidoximu zůstala signifikantně snížena hodnota síly úchopu horních končetin.

Po 24 hodinách zpravidla vedly důsledky intoxikace tabunem ke sníženému příjmu potravy, toto se však statisticky významně neprojevilo na změně jejich tělesné hmotnosti. Snížení hmotnosti se projevilo až při hodnocení po sedmi dnech, ale ani zde nebylo statisticky významné. Snížení hmotnosti pokusných zvířat souvisí s vysokým energetickým výdejem organismu, který je spojen se svalovými křečemi na jedné straně a s nekomfortním stavem zvířete, nevolností, změněnou emocionalitou, psychologickým stavem a dezorientací na straně druhé (Jacobson-Kram 2001).

V této práci jsme se zaměřili na porovnání terapeutických výsledků jednotlivých oximů, z nichž jsme vybrali HI – 6, obidoxim, KO74 a KO75. Tyto oximy byly vybrány na základě výsledků pokusů, které již proběhly v minulosti a byly zde také testovány nově připravené látky KO74 a KO75, které byly syntetizovány na Katedře toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové.

Obidoxim je v současné době běžně používaným a komerčně dostupným oximem určeným pro léčbu intoxikací organofosfáty (Dawson 1994). Ačkoli nevykazuje dostatečnou terapeutickou účinnost v případě otravy jinou NPL, somanem (Kassa 1999, Kassa 2000), výsledky dřívějších prací poukázaly na relativně dobrý terapeutický potenciál při terapii intoxikace vyvolané tabunem.

Oxim HI – 6 byl v minulosti vyvinut a zaveden do praxe některými zeměmi pro jeho vysokou reaktivační a terapeutickou účinnost. Je velmi účinný při eliminaci jednotlivých faktorů neurotoxicity navozené intoxikací somanem (Dawson 1994, Kassa 1995). Tato práce v souladu s předešlými výsledky však potvrdila, že je tato látka méně terapeuticky účinná vůči intoxikaci navozené tabunem než obidoxim.

Terapie akutních otrav vyvolaných nejstarší NPL tabunem, nebyla dosud uspokojivě vyřešena. Obtížná reaktivovatelnost této látky je dána odlišným prostorovým uspořádáním molekulární struktury tabunu. Tato rozdílnost je příčinou snížené reaktivity inhibované AChE s pyridiniovými oximy (Cabal 1999). Důvodem jejich nízké reaktivační schopnosti je přítomnost volného elektronového páru lokalizovaného na amidovém dusíku, která velmi ztěžuje nukleofilní zásah do struktury inhibovaného enzymu (Eto 1976).

V tuto chvíli je obtížné objasnit příčiny vyšší účinnosti obidoximu v porovnání s ostatními testovanými oximy. Tento rozdíl ve schopnosti eliminovat tabunem navozenou neurotoxicitu je zřejmě způsoben odlišností v prostorovém uspořádání užitých oximů a také počtem oximových skupin a jejich pozicí na pyridiniovém skeletu (Cabal 1999).

Faktem zůstává, že v současné době neexistuje univerzální či širokospektrý reaktivátor AChE, kterým by bylo možné uspokojivě potlačit akutní toxické účinky všech NPL (Kunešová 2005). Reaktivační účinnost jednotlivých oximů vůči jednotlivým NPL není shodná. Obidoxim je nejúčinnějším reaktivátorem při intoxikaci vyvolané tabunem, porovnáme-li však jeho účinnost s oximem HI – 6 při intoxikaci somanem, zjistíme že není dostatečně účinný (Kassa 2000).

V této práci byly hodnoceny účinnosti jednotlivých reaktivátorů, které byly podávány vždy v kombinaci s atropinem. Atropin je v terapii běžně užívaná anticholinergní látka u které výrazně převažuje působení na muskarinové receptory na periférii, poměrně méně působí v centrálním nervovém systému, protože velmi obtížně prochází přes hematoencefalickou bariéru. Prakticky vůbec pak neovlivňuje receptory nikotinové ve vegetativních gangliích a nervosvalové ploténce (Bajgar 1991). Proto se toto antidotum podává s cílem antagonizovat salivaci, bronchiální

sekreci a bronchokonstrikci, zatímco kosterní svalstvo, včetně svalů respiračních, zůstávají touto látkou neovlivněny a tedy paralyzovány (Vopršalová 1996).

Pro další zlepšení již nastavené antidotní terapie lze v dalších pokusech navrhnout nahrazení anticholinergika atropinu, za anticholinergikum s výraznějším centrálním účinkem. Mezi tyto látky patří benaktyzin, který je již v AČR zaveden a na základě experimentálních výsledků lze do této skupiny také zařadit látky biperiden a skopolamin. Kunešová (2005) konstatuje na základě výsledků její práce, že všechna touto studií testovaná anticholinergika s vyšším centrálním působením (benaktyzin, biperiden, skopolamin) v kombinaci s oximem vedla k zvýšení ochrany zvířat proti účinkům tabunem navozené neurotoxicity a jejich neuroprotektivní efekt byl silnější než účinek terapie obsahující atropin. Mezi těmito testovanými centrálně působícími anticholinergiky se pak jevil jako nejúčinnější biperiden.

Z těchto údajů zjištěných v experimentálních podmínkách se dá usuzovat, že nejlepšího terapeutického efektu bude dosaženo budeme-li podávat obidoxim v kombinaci s centrálně působícím anticholinergikem, nejlépe biperidenem.

Dále by bylo žádoucí doplnit již nastavenou terapii látkou s antikonvulzivním účinkem, nejčastěji v této indikaci je používán diazepam, a to z důvodu malé schopnosti atropinu zabránit centrálním záchvatům vedoucím k tonicko – klonickým křečím.

Avšak ani optimální nastavení terapie skládající se z reaktivátoru acetylcholinesterázy, anticholinergika a antikonvulziva nemusí úspěšně odvrátit hrozbu poškození nebo úmrtí organismu, zvláště v případě expozice organismu vyšším dávkám tabunu. K dalšímu zmírnění nežádoucích účinků je vhodné také doplnit terapii profylakticky působící látkou, protože tabunem navozené toxické účinky jsou mimořádně odolné vůči zpětným terapeutickým zásahům. Toto je

vysvětlováno nízkou reaktivační účinností v současnosti používaných oximů vůči tabunu (Clement 1987, Jokanovic 1996, Puu 1986).

Podání oximů v kombinaci s běžně užívanou anticholinergní látkou atropinem vedlo k eliminaci neurotoxického účinku tabunu, ale některé z hodnocených parametrů byly i nadále hodnoceny jako statisticky významně odlišné od normálních hodnot. Proto by pro další zlepšení terapie bylo možno navrhnout podání profylakticky působící terapie, protože přítomnost jakéhokoli množství reaktivátoru v krevním oběhu před otravou nervově paralytickými látkami je velkým přínosem pro následnou antidotní léčbu.

6 ZÁVĚR:

V této práci jsme hodnotili experimentálně navozenou neurotoxicitu tabunem, který je řazen mezi nervově paralytické látky, které jsou velmi toxické pro všechny teplokrevné organismy. K hodnocení výsledků jsme použili soubor vybraných dílčích metod a parametrů, zařazených do komplexní Funkční pozorovací baterie, která obsahovala celkem 47 námi hodnocených parametrů motorických, senzitivních a autonomních nervových funkcí.

Tabun byl experimentálním zvířatům podáván intramuskulárně v letální dávce 1 LD₅₀. Výsledné parametry pak byly hodnoceny ve dvou časových intervalech: 24 hodin a 7 dní po aplikaci otravné látky. Byla-li podávaná následná terapie, pak byla aplikována také intramuskulárně, vždy 1 minutu po intoxikaci tabunem.

Terapie byla vybrána na základě v minulosti provedených pokusů, jako srovnávací standardy byly vybrány oximy HI – 6 a obidoxim a to z důvodů jejich dostupnosti v terapii a odlišných terapeutických schopností. Nejlepší dosud známý reaktivátor pro intoxikaci tabunem je obidoxim. HI – 6 s velmi dobrými výsledky užívaná při terapii intoxikace ostatními NPL, byla u tabunu prokázána jako méně efektivní. Dále byly v této práci porovnávány terapeutické účinnosti dvou nově syntetizovaných látek, a to KO74 a KO75.

Oximy byly vždy podávány v ekvimolárních množstvích. Terapie obsahovala mimo tyto oximy i anticholinergně působící látku. Jako anticholinergně působící látka byl vybrán dnes běžně v terapii otrav organofosfátů užívaný atropin.

Terapie eliminovala mnoho tabunem navozených projevů neurotoxicity, avšak žádná v terapii použitá látka neeliminovala tyto projevy absolutně. Dle našeho očekávání nejhorší výsledky vykázal oxim HI – 6. Nově syntetizované látky

vykazovaly lepší terapeutickou účinnost, jako velmi nadějná látka se nám jevil oxim KO75, jehož účinek po uplynutí 24 hodin a 7 dní byl srovnatelný s účinkem obidoximu. U oximu KO74 nedošlo k tak výrazné úpravě námi sledovaných parametrů.

Výsledky této práce jsou však jenom předběžné vzhledem k malému souboru potkanů a interindividuální variabilitě zvířat obecně. Další studie by měly být provedeny pro ověření výsledků a zjištění terapeutických účinků nově syntetizovaných oximů u jiných nervově paralytických látek.

7 PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat lidem, kteří přispěli ke vzniku této práce. Jsou to hlavně mí školitelé: Mgr. Gabriela Kunešová, PhD., která mi pomohla mnoha cennými radami při přípravě nejen této diplomové práce, ale mimo jiné také uvedením do problematiky týkající se nervově paralytických látek, a také MUDr. Peteru Višňovskému, CSc.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Kamilu Kučovi a Mgr. Danielovi Junovi za poskytnutí materiálů a vysvětlení problematiky oximových reaktivátorů.

Děkuji také paní Evě Reslové za pečlivé a svědomité provedení laboratorního pokusu a vysvětlení průběhu a hodnocení výsledků Funkční pozorovací baterie a všem, kteří zde nejsou uvedeni, ale poskytli mi cenné rady pro zpracování práce, nebo mi jakýmkoliv způsobem pomohli.

Autorka

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

ABOU-DONIA, M. B. *Neurotoxicity*. 1st ed. Boca Raton (USA): CRC Press, 1992, p. 621.

ABOU-DONIA, M. B. *Organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2003, vol. 58, no. 8, p. 511 – 548.

BAJGAR, J. *Historie používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu*. Hradec Králové: Učební texty VLA JEP, (ed. PAČES, J.), 302, 1996, p. 4 – 22.

BAJGAR, J. – FUSEK, J. – HRDINA, V. *Vojenská toxikologie*. Hradec Králové: Učební texty VLA JEP, (ed. KVĚTINA, J.), 260, 1991, p. 14 – 42.

BALASUBRAMANIAN, A. S. *Amyloid beta peptide processing, insulin degrading enzyme and butyrylcholinesterase*. Neurochemical Research, 2001, vol. 26, p. 453 – 456.

BARAK, D. – ORDENTLICH, A. – BROMBERG, A. – KRONMAN, C. et al. *Biochemistry*, 1995, vol. 34 (47), p. 15444.

BRABEC, V. – VACHEK, J. *Profylaktické antidotum proti NPL – PANPAL (tablety)*. Zpravodaj vojenské farmacie, 2000, vol. 3, p. 11 – 12.

BUREŠ, J. – BUREŠOVÁ, O. – HUSTON, J. *Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 1976, p. 277.

CABAL, J. – BAJGAR, J. *Tabun – návrat po padesáti letech*. Chemické listy, 1999, vol. 93, p. 27 – 31.

CLEMENT, J. G. – SHILOFF, J. D. – GENNINGS, C. *Efficacy of a combination of acetylcholinesterase reactivators, HI-6 and obidoxime, against tabun and soman poisoning in mice*. Archives of Toxicology, 1987, vol. 61, p. 70 – 75.

DAVISON, A. N. *Return of cholinesterase activity in the rat after inhibition by organophosphorus compounds*. Biochemical Journal, 1955, vol. 60, p. 339 – 346.

DAWSON, R. M. *Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning*. Journal of Applied Toxicology, 1994, vol. 14, p. 317 – 331.

DOUGHERTY, D. A. – STAUFFER, D. A. Science, 1990, vol. 250, p. 1558.

EDDLESTON, M. *Patterns and problems of deliberate selfpoisoning in the developing world*. Quaterly Journal of Medicine, 2000, vol. 93, p. 715 – 731.

ETO, M. *Organophosphorus pesticides: Organic and biological chemistry*. Cleveland (USA): CRC Press Inc., 1976, p. 142.

FRANTÍK, E. – HORNYCHOVÁ, M. *Clustering of neurobehavioral measures of toxicity*. Homeostasis in Health and Diseases, 1995, vol. 36, p. 19 – 25.

GORDON, C. J. *Thermoregulation in laboratory mammals and humans exposed to anticholinesterase agents*. Neurotoxicology and Teratology, 1994, vol. 16, p. 427 – 453.

HARTL, J. et al. *Farmaceutická chemie II/1*. Praha: Karolinum, 2001, p. 47-54.

HIROTA, S. A. *A quick guide to muscarinic acetylcholine receptors*. Biopharmaceutics Journal, 2001, vol. 5, p. 6 – 8.

CHILDS, A. F. – DAVIES, D. R. – GREEN, A. L. – RUTLAND, J. P. *The reactivations by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organophosphorus compounds*. British Journal of Pharmacology, 1955, vol. 10, p. 462 – 465.

JACOBSON-KRAM, D. – KELLER, K. A. *Toxicology testing handbook*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001, p. 428.

JONANOVIC, M. et al. *Oxime-induced reactivation of acetylcholinesterase inhibited by phosphoramidates*. Toxicology Letters, 1996, vol. 85, p. 35 – 39.

KARRALLIEDDE, L. – SENANAYAKE, N. *Organophosphorus insecticide poisoning*. Journal of International and Federal Clinical Chemistry, 1999, vol. 11, no. 2, p. 4 – 9.

KASSA, J. *Comparison of efficacy of two oximes (HI – 6 and obidoxime) in soman poisoning in rats*. Toxicology, 1995, vol. 101, p. 167 – 174.

KASSA, J. *Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents*. Journal of Toxicology, 2002, vol. 40, p. 803 – 816.

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

KASSA, J. – KOUPILOVÁ, M. *Neuroprotective effects of currently used antidotes in soman-poisoned rats*. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2000, vol. 67, p. 663 – 668.

KASSA, J. – KRS, O. – CABAL, J. *Základy vojenské toxikologie o ochrany proti BCHL: pro posluchače VLA JEP farmaceutického směru*. Hradec Králové: Učební texty VLA JEP, (ed. PAČES, J.), 1993, p. 37 - 50.

KOČÍ, A. et al. *Universum: Všeobecná encyklopedie*. Praha: Euromedia Group, 2003, p. 1267.

KOEHN, G. L. – KARZMAR, A. G. *Effect of diisopropyl phosphofluoridate on analgesia and motor behavior in the rat*. Progress in Neuro – Psychopharmacology, 1978, vol. 2, p. 169 - 177.

KOELLE, G. B. *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*. Handbud der experimentellen Pharmakologie. Berlin: Spring – Verlang, 1963.

KUNEŠOVÁ, G. *Hodnocení efektivity terapie experimentální intoxikace tabunem na základě neurobehaviorálních metod*. Doktorská dizertační práce, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, 2005, p. 5 –53.

KUTTY, K. M. – PAYNE, R. H. *Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism*. Journal od Clinical Laboratory Analysis, 1994, vol. 8, p. 247 -250.

LAMKA, J. – DUCHÁČEK, L. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Praha: Karolinum, 1998, p. 77.

LAYER, P. G. – WILLBOLD, E. *Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease*. Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 1995, vol. 29, p. 1 – 94.

LE NOVERE, N. – CORRINGER, P-J. – CHANGEUX, J-P. *The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences*. Journal Neurobiology, 2002, vol. 53, p. 447 –456.

LINCOVÁ, D. – FARGHALI, H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén a Karolinum , 2002, p. 98 – 136.

LÚLLMAN, H. – MOHR, K. – WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada Publishing, a. s., 2004, p. 595 - 598.

MAJEWSKI, M. – SEFARIN, B. *Wiadomosci Chemiczne*, 1979, vol. 33, p. 75.

MARTÍNKOVÁ, J. et al. *Vybrané kapitoly z farmakologie*. Hradec Králové: Učební texty, 2002, p. 8.

MORITA, H. et al. *Sarin poisoning in Matsumoto*. Japanese Lancet, 1995, vol. 346, no. 8970, p. 290 – 293.

MOSER, V.C. et. al. *Comparison of chlordimeform and caryaryl using a functional observational battery*. Fundamental and Applied Toxicology, 1988, vol. 11, p. 139 – 206.

MOSER, V. C. – CHEEK, M. B. – MacPHAIL, R. C. *A multidisciplinary approach to toxicological screening*. III. Neurobehavioral toxicity. Journal of Toxicology and Environmental Health, 1995, vol. 45, p. 173 – 210.

NEVŠÍMALOVÁ, S. – RŮŽIČKA, E. – TICHÝ, J. et al. *Neurologie*. Praha: Galén, 2002, p. 187.

OHBU, S. et. al. *Sarin poisoning on Tokyo subway*. Southern Medicinal Journal, 1997, vol. 90, p. 587 – 593.

PALACIOS, J. M. – BODDEKE, H. W. – POMBO-VILLAR, E. *Cholinergic neuropharmacology: an update*. Acta Psychiatrica Scandinavian Suppl, 1991, vol. 366, p. 27 – 33.

PATOČKA, J. et al. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada Publishing, 2004a, p. 30 – 44.

PATOČKA, J. – KUČA, K. – JUN, D. *Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body*. Acta Medica (Hradec Králové), 2004b, vol. 47, p. 215 – 228.

PATON, W. D. – ZAIMIS, E. *The methoinum*. Pharmacological Review, 1952, vol. 4, p. 219 – 253.

PROKEŠ, J. et al. *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Praha: Galén a Karolinum, 2005, p. 169 -173.

PRYOR, G. T. et al. *Assessment of chemicals using a battery of neurobehavioral tests: a comparative study*. Neurobehavioral Toxicology and Teratology, 1983, vol. 5, p. 91 – 117.

PRYMULA, R. et al. *Biologický a chemický terorismus: Informace pro každého*. Praha: Grada Publishing, 2002, p. 94 – 122.

PUU, G. – ARTURSSON, E – BUCHT, G. *Reactivation of nerve agent inhibited acetylcholinesterase by HI – 6 and obidoxime*. Biochemical Pharmacology, 1986, vol. 35, p. 1505 – 1510.

SALAMONE, J. D. et al. *Lateral striatal cholinergic mechanism involved in oral motor activities in the rat*. Psychopharmacology, 1990, vol. 102, p. 529 – 534.

SCARPETO, H. M. – DMOCHOWSKI, R. R. *Muscarinic receptors: what we know*. Current Urology Reports, 2003, vol. 4, p. 421 – 428.

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 & Therapeutics, 1995, vol. 67, p. 283 – 322.

TILSON, H. A. – MOSER, V. C. *Comparison of screening approaches*. Neurotoxicity, vol. 1992, p. 1 – 14.

TROJAN, S. et al. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, 2003, p. 649 – 655.

VANDEKAR, M. – HEATH, D. F. *The reactivation of cholinesterase after inhibition in vivo by some dimethyl phosphate esters*. Biochemical Journal, 1957, vol. 67, p. 202 – 208.

VOLPICELLI, L. A. – LEVEY, A. I. *Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus*. Progress in Brain Research, 2004, vol. 145, p. 59 – 66.

VOPRŠALOVÁ, M. – ŽÁČKOVÁ, P. *Základy toxikologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1996, p. 144 – 150.

WILSON, I. B. *Acetylcholinesterases. IX. Reversibility of tetraethylpyrophosphate inhibition*. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 190, p. 111 – 117.

WILSON, I. B. – GINSBURG, S. *Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphates*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1955, vol. 54, p. 269 – 271.

ZAJTCHUK, R. – BELLAMY, R. F. *Medical aspects of chemical and biological warfare*. Office of the Surgeon General, Department of the Army. USA, p. 721.