

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmaceutické chemie
a kontroly léčiv

**PROBLEMATIKA INHIBICE CHOLINESTERAS
VYBRANÝMI ORGANOFOSFOROVÝMI
PESTICIDY
*IN VITRO***

Diplomová práce

Hradec Králové 2007

Helena Lázenská

V úvodu bych ráda poděkovala RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. a Mgr. Danielu Junovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas a pomoc při vypracování diplomové práce. Poděkování patří i celému kolektivu Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové za vstřícný přístup a příjemné pracovní prostředí.

1. Obsah

1.	Obsah	3
2.	Úvod práce.....	7
3.	Cíl práce	9
4.	Teoretická část	11
4.1.	<i>Cholinergní přenos</i>	12
4.2.	<i>Cholinesterasy</i>	14
4.2.1.	Acetylcholinesterasa	14
4.2.2.	Butyrylcholinesterasa	15
4.3.	<i>Látky modulující cholinesterasovou aktivitu.....</i>	16
4.3.1.	Inhibitory cholinesteras	16
4.3.2.	Reverzibilní inhibitory cholinesteras a léčba Alzheimerovy demence	17
4.3.3.	Reaktivátory cholinesteras	21
4.4.	<i>Pesticidy</i>	23
4.4.1.	Organofosforové inhibitory	23
4.4.2.	Karbamátové inhibitory.....	32
4.5.	<i>Měření aktivity enzymu</i>	34
4.6.	<i>Metody měření aktivity cholinesteras.....</i>	35
4.7.	<i>Testování reaktivační účinnosti oximů in vitro</i>	37
5.	Praktická část	38
5.1.	<i>Použité chemikálie.....</i>	39
5.2.	<i>Příprava roztoků</i>	40
5.2.1.	Příprava PB	40
5.2.2.	Příprava vzorků	40
5.2.3.	Příprava substrátů	40
5.2.4.	Příprava činidla.....	41
5.2.5.	Příprava inhibitoru	41
5.2.6.	Příprava reaktivátoru	42
5.3.	<i>Použité přístroje.....</i>	43
5.4.	<i>Podmínky měření.....</i>	43
5.5.	<i>Postupy měření.....</i>	43
5.5.1.	Měření aktivity enzymu	43
5.5.2.	Sledování kinetiky inhibice ChE vybranými organofosforovými inhibitory	44
5.5.3.	Stanovení hodnot IC_{50} zkoušených inhibitorů	45
5.5.4.	Testování reaktivační účinnosti vybraných reaktivátorů	45
5.6.	<i>Zpracování naměřených dat</i>	47
6.	Výsledky měření	48
6.1.	<i>Výsledky kinetiky inhibice, zjištěné hodnoty $T_{1/2}$.....</i>	49
6.2.	<i>Zjištěné hodnoty IC_{50}</i>	57
6.3.	<i>Výsledky testování reaktivační účinnosti</i>	65

7.	Diskuse a závěr	71
8.	Seznam literatury	76

Seznam použitých zkratek:

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa (E.C. 3.1.1.7)
AcThCh	acetylthiocholin
AD	Alzheimerova demence
BuChE	butyrylcholinesterasa (E.C. 3.1.1.8)
BuThCh	butyrylthiocholin
CI	konfidenční interval
CNS	centrální nervová soustava
CoA	koenzym A
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
DFP	diisopropylfluorofosfát
DDVP	dichlorvos
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina
GIT	gastrointestinální trakt
HCH	hexachlorcyklohexan
HEB	hematoencefalická bariéra
ChAT	cholinacetyltransferasa (E.C. 2.3.1.6)
ChE	cholinesterasa
IPR	isopropylalkohol
iso-OMPA	tetraisopropylpyrofosforamid
KVS	kardiovaskulární systém
NPL	bojové chemické látky s nervově paralytickým účinkem
NTE	neurotoxická esterasa (E.C. 3.1.1.1)
OFI	organofosforový inhibitor
PB	0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VNS	vegetativní nervový systém
WHO	světová zdravotnická organizace

2. Úvod práce

Organofosforové a karbamátové pesticidy a bojové chemické látky s nervově paralytickým účinkem (NPL) jsou vysoce toxické sloučeniny, inhibující v lidském těle enzymy AChE a BuChE. V důsledku inaktivace enzymu AChE, jehož funkcí je v synapsích rozkládat neuromediátor ACh, dochází v organismu v závislosti na dávce noxy k jeho akumulaci, a tím k hyperstimulaci muskarinových a nikotinových receptorů za vzniku cholinergní krize, která může vést až ke smrti intoxikované osoby.

OFI mají dominantní postavení mezi bojovými chemickými látkami používanými pro vojenské účely, méně toxické sloučeniny jsou pak široce používány jako pesticidy v zemědělství – podle WHO způsobují celosvětově miliony případů otrav ročně a přibližně 200 000 z nich končí fatálně, převážně v rozvojových zemích. Mimo to zde existuje stále rostoucí hrozba teroristického zneužití NPL (viz např. tokijský sarinový útok v roce 1995). Se stoupajícím rizikem intoxikací těmito látkami se stává vývoj dostatečně účinných antidot velmi důležitým a nezbytným. Jako antidota v případech otrav jsou podávána anticholinergika a reaktivátory AChE – látky schopné znovu obnovit fyziologickou funkci tohoto enzymu [1,2]. V poslední době se pozornost výzkumu soustřeďuje na BuChE, která má schopnost fungovat jako tzv. bioscavenger OFI, a tím sloužit jako nespecifické profylaktikum otrav. Jiné nové přístupy jsou zaměřeny na vývoj BuChE, která by byla schopná zachytit inhibitor, detoxifikovat ho a znovu sloužit jako scavenger. AChE reaktivátory používané v současnosti jako antidota otrav způsobených NPL, organofosforovými a karbamátovými pesticidy, by mohly reaktivovat inhibovanou BuChE, a tak sloužit jako tzv. pseudokatalytické bioscavengery [3,4].

3. Cíl práce

Cílem této práce bylo:

- popsat a zhodnotit OFI paraoxon, DDVP a DFP z hlediska kinetiky jejich reakce s lidskou erytrocytární AChE a plazmatickou BuChE a určit odpovídající hodnoty IC_{50} .
- u pěti vybraných reaktivátorů ChE (pralidoxim, methoxim, trimedoxim, obidoxim a HI-6), používaných jako antidota při otravách NPL, organofosforovými a karbamátovými pesticidy, zjistit a vzájemně porovnat jejich *in vitro* reaktivační účinnost u lidské erytrocytární AChE a plazmatické BuChE inhibovaných vybranými OFI.

4. Teoretická část

receptorů se předpokládá existence podtypů M_1 (neurální), M_2 (srdeční) a M_3 (glandulární). M_1 receptor se vyskytuje ve vegetativních gangliích, CNS a v buňkách exokrinních žláz; jeho aktivací dochází ke vzniku akčního potenciálu a k usnadnění nervového přenosu. M_2 receptor zprostředkovává účinek ACh na srdce – otevření iontového kanálu pro K^+ ionty vede k jeho negativně chronotropnímu a dromotropnímu ovlivnění. Aktivace M_3 receptoru vede ke kontrakci hladké svaloviny. V CNS jsou zastoupeny všechny tři typy M receptorů, kde zajišťují různé funkce, jako např. kontrolu motoriky, paměťové funkce, přenos a modulaci bolestivých podnětů. Antagonistou všech typů M receptorů je atropin, receptor N_M je antagonizován tubokurarinem, receptor N_N trimetafanem [5,8].

Vazba na receptor je krátkodobá, ACh je rychlou hydrolýzou inaktivován jednak působením specifické AChE, která se nachází na presynaptických i postsynaptických membránách, tak i působením BuChE, která je přítomná v séru a intersticiální tekutině [5,8]. Kladně nabitý dusík substrátu ACh interaguje s anionickým centrem receptoru ChE, které má negativní dílčí náboj. Stabilizace vzniklého iontového páru se patrně účastní aromatické aminokyseliny. Na štěpení esteru se podílí serinový zbytek (esteratické centrum), jehož hydroxylová skupina přebírá kovalentní vazbou acetylovou skupinu ACh. Acetylace esterasy přetrvává pouhé milisekundy, poté je enzym rychle reaktivován hydrolytickým odštěpením kyseliny octové. Receptor se vrací do původního stavu, cholin je více než z 50 % aktivním mechanismem recyklován do nervového zakončení, kde může být opět použit pro syntézu ACh [5,9,10].

4.2. Cholinesterasy

ChE jsou významnými enzymy patřící do skupiny esterasy, enzymů hydrolyticky štěpících estery karboxylových kyselin, přičemž ChE jsou serinové hydrolasy, které katalyzují hydrolýzu esterů cholinu [11].

V lidském těle existují různé typy ChE, které se liší např. svou strukturou, rozložením v organismu, fyziologickou funkcí, specifitou a afinitou k substrátům a inhibitorům, kinetikou nebo svým chováním v nadbytku substrátu. Dvěma hlavními typy ChE jsou AChE, označovaná také jako pravá nebo specifická, a BuChE, známá též jako plazmová, pseudo nebo nespecifická [12,13,14].

4.2.1. Acetylcholinesterasa

AChE má největší zastoupení v CNS a erytrocytární membráně, dále se vyskytuje v nervových zakončeních, plicích, nebo slezině [12].

Molekula AChE je tvořena dvěma peptidovými řetězci α a β . Aktivní místo enzymu, na němž dochází k rozkladu ACh, je lokalizováno v α -řetězci. Skládá se z α -anionického místa tvořeného koncovým karboxylem kyseliny asparagové, případně glutámové, a esteratického centra, které je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu. V β -řetězci se nachází tzv. β -anionické místo a oblast hydrofobních interakcí, tzv. γ -anionické místo [9].

Interakce ACh s AChE je podobná jeho interakci s cholinergními receptory. Nejprve dochází k vytvoření iontové vazby mezi amoniovou skupinou ACh a α -anionickým místem enzymu, důležitou roli hrají i hydrofobní interakce. Navázaný ACh se štěpí na cholin, který je na enzym vázán jen slabými vazbami, a zbytek kyseliny octové, který je přenesen z ACh na serinový hydroxyl esteratického centra. Vznikne tak acetylovaná AChE, která během zlomků sekundy podléhá reaktivaci hydrolytickým odštěpením kyseliny octové [9].

Hlavní biologickou funkcí AChE je ukončení přenosu na cholinergních synapsích prostřednictvím rychlé hydrolýzy neuropřenašeče ACh, její fyziologická

funkce v krvi je nejasná. AChE je jedním z nejvýkonnějších enzymů, 1 mol tohoto enzymu má schopnost hydrolyzovat 300 000 molekul ACh za minutu [11,13].

Specifickými substráty AChE jsou ACh a blízké příbuzné estery (např. metacholin), v jejichž nadbytku je AChE inhibována. Selektivním inhibitorem pro AChE je sloučenina 1,5-bis(4-allyldimethylaminopropyl)pentan-3-on-dibromid [11,14].

4.2.2. Butyrylcholinesterasa

BuChE se nachází především v plazmě, játrech, ale i v kůži, hladkém svalu, střevech, slinivce břišní, srdci a bílé hmotě CNS [12].

BuChE má podobnou molekulární strukturu jako AChE, oba enzymy se shodují v 65 % sekvence aminokyselin, mají podobné molekulární formy a strukturu aktivního centra. BuChE je glykoprotein tvořený čtyřmi identickými podjednotkami, postrádá anionické centrum a některé aromatické zbytky [11,12].

Fyziologická funkce BuChE je oproti AChE méně důležitá a po dlouhou dobu zůstávala nejasná. V dnešní době se jí přisuzuje úloha v cholinergní neurotransmisii, v buněčné proliferaci a udržování správné funkce myelinu, růstu neuritů během vývoje nervové soustavy a např. u neurodegenerativních poruch [13]. Aktivita BuChE v mozku vzrůstá s věkem a u jedinců trpících AD, její absence však nemá vztah k žádné fyziologické abnormalitě. BuChE má spíše farmakologický a toxikologický význam – jelikož je kromě esterů cholinu schopna hydrolyzovat i jiné estery, hraje roli v metabolismu některých léčiv, např. prokainu nebo suxamethonia, nebo při odklizení inhibitorů ChE, včetně OFI. Dále se např. experimentálně využívá při léčbě kokainové závislosti, jako specifický marker v diagnostice AD, nebo je v současnost testována jako nový terapeutický prostředek v profylaxi otrav způsobených inhibitory ChE [11,12].

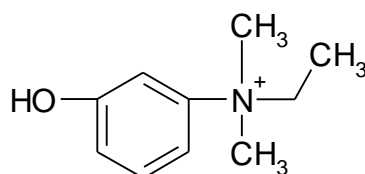
BuChE má oproti AChE širší substrátovou specifitu, hydrolyzuje butyrylcholin a propionylcholin až 4krát rychleji než ACh, neštěpí metacholin, v nadbytku substrátu je aktivována a je selektivně inhibována sloučeninou iso-OMPA [11,14].

4.3. Látky modulující cholinesterasovou aktivitu

4.3.1. Inhibitory cholinesteras

Inhibitory ChE, látky schopné inaktivovat funkci těchto enzymů, se vzájemně liší chemickou strukturou, selektivitou pro oba enzymy, mechanismy a reverzibilitou procesu inhibice. Podle charakteru a místa vazby na aktivním povrchu enzymu mohou být rozděleny na acylující a neacylující [7].

Neacylující inhibitory obsadí vazebné místo enzymu, a tak kompetitivně brání přístupu ACh k aniontovému místu enzymu. Protože se nevytváří kovalentní vazba, vyvolávají krátkodobou, plně vratnou inhibici. Jediným důležitým zástupcem této skupiny je kvartérní amoniová sloučenina edrofonium, která se používá k diagnostickým účelům u onemocnění myasthenia gravis. Pro terapeutické účely je však účinek edrofonia příliš krátký [7,9,15].



edrofonium

Mezi nejvýznamnější inhibitory acylujícího typu patří organofosforové a karbamátové inhibitory, které účinně inhibují AChE i BuChE. Oba typy jsou tzv. izosterickými inhibitory, neboť místem jejich vazby je stejná funkční skupina aktivního povrchu enzymu jako pro substrát. Reagují s esteratickým centrem, které je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu, a acylují jej za vzniku kovalentní vazby. Tato vazba může být natolik stabilní, že se jedná o inhibici irreverzibilní [7,15,16].

Klinicky nejvýznamnějším toxickým účinkem inhibitorů ChE je inhibice AChE, absence aktivity BuChE nemá vztah k žádné fyziologické abnormalitě. Inhibitory AChE působí všude tam, kde se uplatňuje ACh jako mediátor přenosu nervového vzruchu. Jejich působením se ACh na straně receptorů hromadí a následně vyvolává jevy

zapříčiněné jejich nadměrnou stimulací. Některé OFI mohou navíc působit neurotoxicky, přičemž tento účinek nesouvisí s inhibicí ChE, ale s inhibicí enzymu NTE [12,13,14]. Celkový účinek těchto látek závisí především na jejich chemických a fyzikálně-chemických vlastnostech (např. na liposolubilitě, stabilitě komplexu enzym-inhibitor a reaktivovatelnosti) [9].

Inhibitory cholinesteras se používají jako pesticidy, insekticidy a chemické bojové látky, také v medicíně nacházejí uplatnění, např. jako cholinomimetika, anthelmintika, ale zejména se aplikují při léčbě chorob, které souvisí s relativním nedostatkem ACh. Nedostatek tohoto neurotransmiteru v neuronálních synapsích vede k progresivnímu onemocnění CNS, tzv. Alzheimerově demenci (AD). Méně častá je autoimunitní svalová nedostatečnost myasthenia gravis, způsobená zablokováním neuromuskulárních ACh receptorů [12,14].

4.3.2. Reverzibilní inhibitory cholinesteras a léčba Alzheimerovy demence

Nový zájem o inhibitory AChE podnítila zjištění, že cholinergní nervový systém, v němž AChE hraje klíčovou úlohu, se významným způsobem podílí na procesech učení a paměti. Cholinergní hypofunkce, charakterizovaná nedostatkem ACh v mozku, vede ke ztrátě kognitivních a všech intelektuálních funkcí člověka a je označována jako demence. Nejvýznamnější neurologickou poruchou tohoto druhu je AD [16]. Toto progresivní neurodegenerativní onemocnění je čtvrtou nejčastější příčinou smrti u osob starších 65 let a nejčastější formou demence (70 %). Etiologie tohoto onemocnění je neznámá, ví se však, že výskyt je podporován genetickou predispozicí i negenetickými faktory (např. věk, úraz hlavy) a prudce vzrůstá s věkem. Hlavními patologickými znaky AD jsou abnormální depozice β -amyloidu, tzv. senilní plaky, dále neurofibrilární shluky a ztráta neuronů. Následkem úbytku mozkové hmoty a lokalizované ztráty neuronů je snížená tvorba a koncentrace neurotransmiterů v mozku – ovlivněny jsou všechny přenašečové systémy, a postupující ztráta mozkových funkcí. Nejvíce je ovlivněna cholinergní transmise v oblastech mozku převážně spojených s pamětí, vyššími intelektuálními schopnostmi a vědomím. V kůře mozku a hippokampu se nachází až

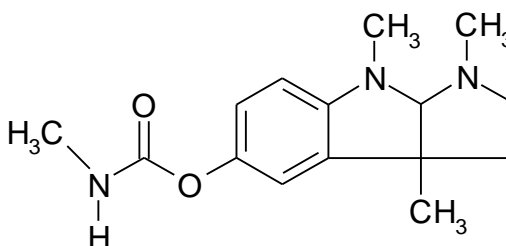
o 90 % nižší koncentrace ChAT. V důsledku snížené aktivity ChAT, AChE a naopak zvýšené aktivity BuChE se objevují snížené hladiny ACh [11,12,17].

Symptomy AD vyplývají z nedostatku ACh. Strategie léčby vedoucí ke zmírnění příznaků a zpomalení progresu onemocnění proto spočívá v inhibičním působení na mozkovou AChE a nověji i BuChE [18]. Nedávné studie totiž ukázaly, že selektivní inhibice BuChE zvyšuje hladinu ACh. BuChE hraje důležitou roli ve vývoji a progresu AD. Kromě esterasové aktivity má i aktivitu peptidasovou; štěpí prekuzory amyloidů, které jsou ve velkém množství přítomny v normálním mozku, na β -amyloidní proteiny, které se usazují a tvoří β -amyloidní plaky. Selektivní BuChE inhibitory tak předcházejí tvorbě nových plaků. BuChE může být využívána i jako specifický marker v diagnostice AD; u těchto pacientů se v cerebrospinální tekutině nachází specifická forma tohoto enzymu [12]. V důsledku působení vhodných ChE inhibitorů je k dispozici více ACh k uskutečnění nervového přenosu. Tyto inhibitory musí být centrálně účinné (tj. musí procházet přes HEB), musí umožňovat kontrolované snížení aktivity mozkové AChE, musí mít značnou terapeutickou šíři a měly by mít co nejméně nežádoucích účinků, protože musí být podávány dlouhodobě [16]. První klinické experimenty byly provedeny s fysostigminem, který se kvůli vysokému poměru nežádoucích a terapeutických účinků nepoužívá. Prvním používaným léčivem byl takrin, který byl pro výskyt vedlejších cholinergních účinků a hepatotoxicity stažen z trhu. V současné době se v terapii uplatňují donepezil, galantamin a nejdůležitější z nich, CNS-selektivní rivastigmin [11,12,17,19]. Dalším z reverzibilních inhibitorů ChE je huperzin A, který se nachází v rostlině *Huperzia serrata* (druh rašeliníku), užívané v čínské medicíně. Huperzin se vyskytuje ve dvou formách – A a B, přičemž forma huperzin B je několikanásobně slabší. V Číně je schválen jako oficiální léčivo u nemocných s AD, v USA je testován armádou jako profylaktikum a antidotum proti některým nervovým jedům. Působí proti degradaci ACh, přičemž výsledky testů na zvířatech prokázaly poměrně vysokou účinnost ve srovnání s léky inhibující AChE. Jeho předností je zvýšená blokáda mozkové AChE namísto AChE periferní nervové soustavy, velmi malé působení na muskarinové receptory a ochrana neuronů proti nadměrné excitaci glutamátových

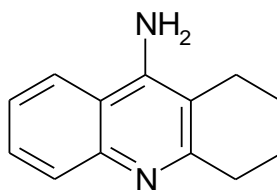
receptorů. Po požití se rychle vstřebává, dobře proniká HEB a pacienty je dobře tolerován [20].

Inhibitory ChE zpomalují progresi AD, neumí ji však zastavit. Nové terapeutické přístupy jsou proto zaměřeny na ochranu neuronů před jejich degenerací. Kromě deficitu ACh hraje u AD velkou roli excesivní uvolňování glutamátu, které vede k excitotoxickému poškození neuronů v CNS. V klinických zkouškách byl prokázán účinek memantinu. Působí jako slabý nekompetitivní antagonist glutamátových NMDA-receptorů a tak brání neurotoxické glutamátu, zatímco fyziologické procesy spojené s pamětí a učením zůstávají neovlivněny. Memantin je prokázaně účinným kognitivem pro léčbu a zpomalování progresi i těžších forem onemocnění a pacienty je velmi dobře tolerován [21,22].

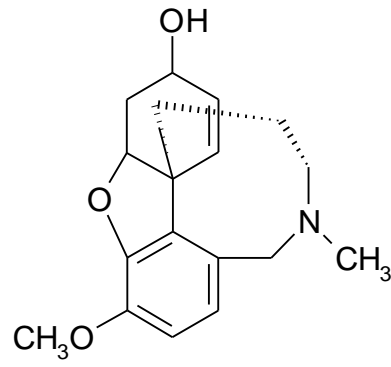
Chemické struktury zmíněných reverzibilních inhibitorů ChE:



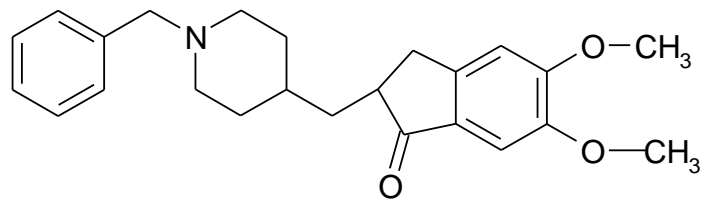
fystigmin



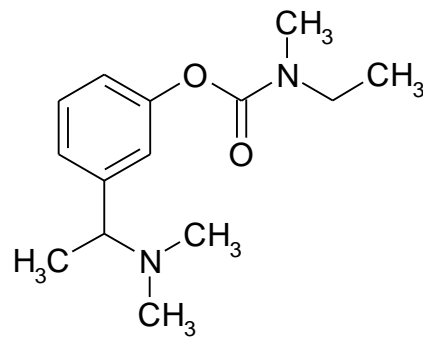
takrin



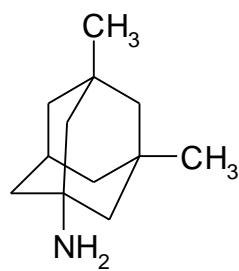
galantamin



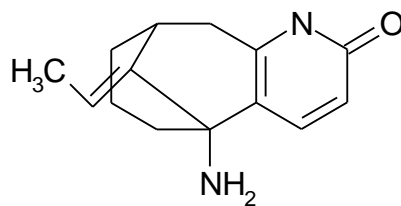
donepezil



rivastigmin



memantin



huperzin A

4.3.3. Reaktivátory cholinesteras

Aktivita nevratně inhibovaného enzymu se sama opět obnoví až po syntéze molekul enzymu *de novo*, tato syntéza však trvá týdny [14]. Nárůst aktivity inhibovaného enzymu probíhá také díky spontánní regeneraci. Tato regenerace nastává různou rychlostí, v závislosti na inhibitoru –u karbamátových inhibitorů během několika minut nebo hodin, zatímco u OFI velice pomalu nebo vůbec. Daleko rychleji je možné v některých případech aktivitu obnovit pomocí tzv. reaktivátorů ChE [13].

Z chemického hlediska řadíme všechny v současnosti používané reaktivátory ChE do skupiny mono- nebo biskvartérních pyridiniových aldoximů. Jedná se o látky se silnou nukleofilitou a velkou afinitou k enzymu [13]. Jediným současně používaným zástupcem monokvartérních oximů je pralidoxim, který ale špatně proniká do CNS. Výhodnější vlastnosti mají biskvartérní pyridiniumaldoximy (např. trimedoxim, obidoxim, HI-6), které mohou reagovat se dvěma anionickými centry a jsou lipofilnější, takže lépe pronikají HEB a působí proti centrálním účinkům OFI [9,13]. Roli v účinnosti reaktivátorů hraje mimo jiné počet pyridiniových kruhů, poloha a počet oximových skupin, a např. délka spojovacího řetězce mezi dvěma pyridiniovými kruhy [1,23].

Průběh reaktivace viz *Schéma 1*. Anion, vzniklý deprotonací kyselé hydroxyiminoskupiny, je silný nukleofil, který je schopný atakovat atom fosforu ve fosforylovaném (fosfonylovaném) enzymu. Výsledkem je obnovení esteratického centra enzymu za současné fosforylace (fosfonylace) oximu [10]. Fosforylovaný (fosfonylovaný) oxim je sám silným inhibitorem ChE, ale je obvykle nestabilní (v závislosti na struktuře oximu) a během krátké doby se rozpadá [11,15].

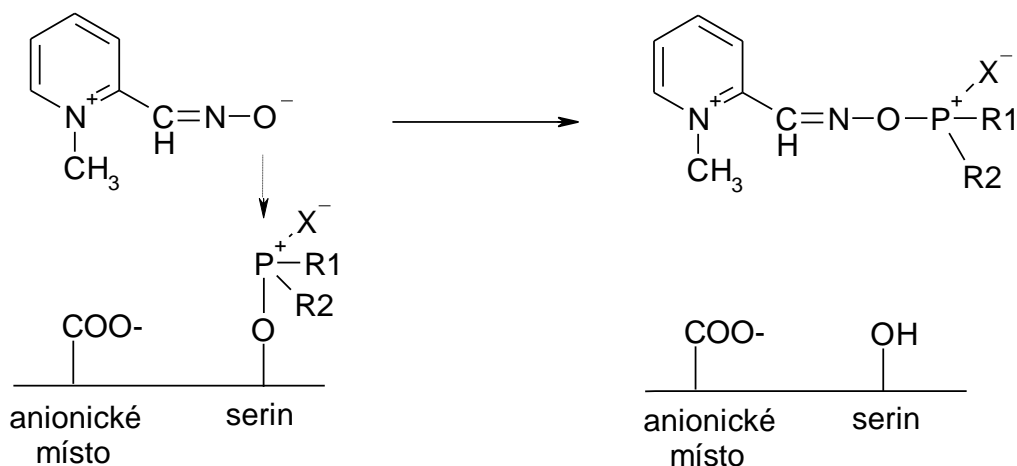


Schéma 1 Průběh reaktivace [9].

Účinnost konkrétního reaktivátoru nazávisí jen na jeho struktuře a koncentraci, ale také např. na struktuře inhibitoru, který způsobil intoxikaci, délce kontaktu s inhibitoru a rychlosti procesu stárnutí [13,24]. Stárnutí je děj, kterému podléhá komplex enzym-inhibitor a při němž tento komplex ztrácí svou vnímavost vůči reaktivaci. Tento proces má zásadní význam pro léčbu intoxikace [7,10]. Reaktivátor musí být podán včas, v efektivní koncentraci a podáván po dostatečně dlouhou dobu [24]. Reaktivátory také nejsou stejně účinné proti všem inhibitorům. V případě otravy neznámým inhibitoru je možné provést tzv. reaktivací test, kdy se k odebrané krvi intoxikované osoby přidají různé reaktivátory a pro léčbu se zvolí ten, který nejvíce obnoví aktivitu ChE. Ačkoliv se OFI používají již od 2. světové války, neexistuje dosud žádné univerzální antidotum. Např. HI-6 je v současnosti nejslibnějším širokospektrým reaktivátorem, který je účinný při inhibici způsobené sarinem, cyklosarinem nebo VX, ale v případě tabunu nebo pesticidů je jeho účinnost nedostatečná [10,25].

4.4. Pesticidy

Pesticidy jsou chemické prostředky, určené k hubení nebo potlačování nejrůznějších organismů, považovaných člověkem za nežádoucí. Používají se na 95 % zemědělské půdy a jejich účinku jsou vystaveny všechny složky biosféry – vzduch, voda, půda, ale i rostliny a živočichové [26]. Jedná se o sloučeniny se širokou škálou toxicity a stálosti, a proto vzhledem k jejich poměrně rozšířenému používání nejsou vyloučeny otravy a zamoření životního prostředí [27].

V současnosti nejpoužívanější druhy pesticidů patří mezi organofosforové a karbamátové inhibitory.

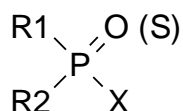
4.4.1. Organofosforové inhibitory

Jednou z nejdůležitějších skupin pesticidů, která nahradila chlorované uhlovodíky (DDT, HCH), je skupina vysoce účinných organických sloučenin fosforu [28]. Více než stovka různých organofosforových sloučenin se používá jako pesticidy, některé z nich (např. tabun, sarin, cyklosin, soman, VX, VR) jsou pro svou mimořádně vysokou toxicitu, snadnou použitelnost, rychle nastupující účinek a vliv na nervový systém řazeny mezi NPL [7,29].

K výhodným vlastnostem organofosforových pesticidů patří vysoká účinnost, široké spektrum účinku a chemická nestabilita, díky níž nedochází ke kumulaci v organismech a životním prostředí. Tyto jejich výhodné vlastnosti oproti chlorovaným uhlovodíkům jsou ve většině případů vykoupeny jejich mnohem vyšší akutní a systémovou toxicitou. Smrtelná dávka pro dospělého člověka se podle druhu sloučeniny odhaduje od 5 mg/kg až 100 mg/kg po p.o. požití, při perkutánní aplikaci je smrtelná dávka 2–3krát vyšší [10,28]. V zemích, kde se pesticidy tohoto typu používají, zapříčiňují každoročně velký počet profesionálních, suicidálních i náhodných otrav, přesto však patří antidota těchto intoxikací mezi tzv. sirotčí léky, které se netěší přílišnému zájmu ze strany farmaceutického průmyslu. Nedostatek účinné terapie, přispívající k vysoké úmrtnosti, a z důvodu vzrůstající hrozby teroristických útoků, je vývoj prostředků proti těmto otravám prioritou armád [28,29,30].

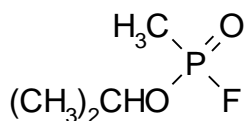
➤ **Struktura**

Nejvýznamnější organofosforové pesticidy a NPL patří mezi estery kyseliny fosforečné a fosfonové nebo jejich thio-deriváty. Obecnou strukturu OFI lze znázornit vzorcem:

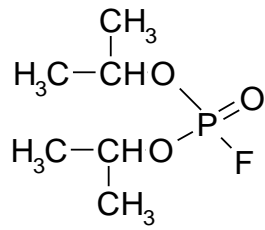


*R₁, R₂...alkyl, alkoxy,subst. amidoskupina, R₁=R₂...organofosfáty,
R₁≠R₂...organofosfonáty; X...C≡N, halogen, fenoxyskupina, alkoxyskupina.*

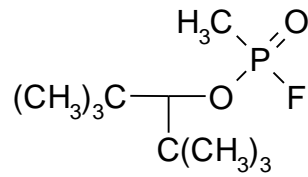
Zatímco pesticidy jsou většinou odvozeny od kyseliny fosforečné, NPL jsou nejčastěji deriváty kyseliny fosfonové, méně pak fosforečné. Obecně platí, že toxicita pesticidů je daleko nižší než toxicita NPL. Vztahy mezi strukturou a účinkem ve skupině OFI lze shrnout takto: estery kyseliny fosfonové bývají toxicitější než analogické estery kyseliny fosforečné, oxosloučeniny (tzv. přímé inhibitory) jsou toxicitější než jejich thioanaloga (tzv. inhibitory nepřímé), která jsou teprve v organismu na oxosloučeniny metabolizována (proto se otrava po expozici přímým inhibitorům projevuje rychleji) a toxicita klesá v řadě X = F, I, CN [9,13,31]. Chemické struktury nejznámějších organofosforových bojových látek (sarin, DFP, soman, tabun, VX) a nejrozšířenějších organofosforových pesticidů (DDVP, paraoxon, parathion, chlorpyrifos):



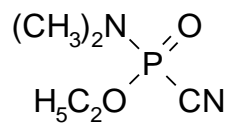
sarin



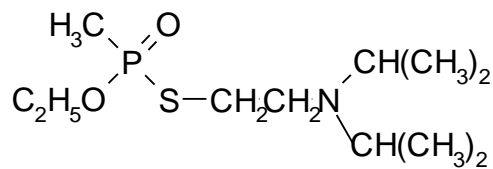
DFP



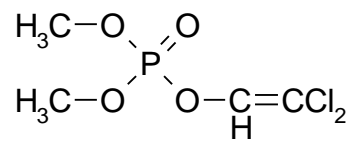
soman



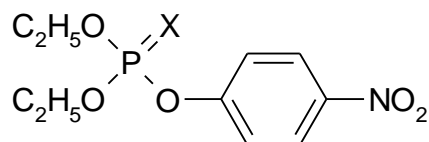
tabun



VX

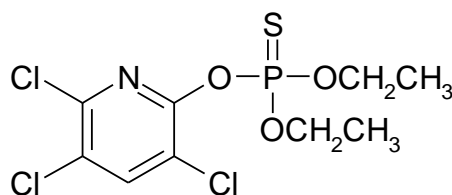


DDVP



$X = \text{O} \dots \text{paraoxon}$

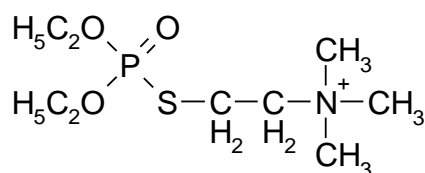
$X = \text{S} \dots \text{parathion}$



chlorpyrifos

➤ Osud v organismu

OFI jsou vysoce lipofilní látky, které se velice rychle absorbují a dobře pronikají HEB, a působí jak periferně, tak centrálně. Výjimkou je echothiofát, který má díky přítomnosti kvartérního dusíku v molekule hlavně periferní účinky. Do organismu savců se dostávají všemi cestami, nejrychleji inhalací, nejpomaleji perkutánně. Perkutánní absorpci usnadňují různá rozpouštědla (xylen, toluen, chlorované uhlovodíky), která jsou součástí pesticidních přípravků. Následkem metabolismu OFI z toxikologického hlediska může být zachování původních vlastností, tvorba metabolitů s vyšším účinkem a toxicitou (např. parathion → paraoxon), nebo detoxikace mateřské látky (např. u malathionu) [9,28].



echothiofát

➤ **Mechanismus toxického účinku, spontánní regenerace, aging**

OFI blokuji životně důležité esterase, nejvýznamnější toxický účinek představuje inhibice AChE – vysoká afinita některých OFI k AChE je příčinou neobyčejně vysoké toxicity těchto látek. Mechanismus účinku spočívá v kovalentní vazbě fosforu na hydroxylovou skupinu molekuly serinu v esteratickém centru ChE. Spontánní regenerace vzniklého komplexu enzym-inhibitor nukleofilním účinkem vody je u většiny OFI velmi pomalá, za fyziologických podmínek prakticky neprobíhá. Inhibice má tedy irreverzibilní charakter a otravy způsobené těmito látkami jsou proto tolik nebezpečné. Znovuobnovení enzymatické aktivity může trvat i týdny a závisí na rychlosti syntézy nových molekul enzymu [10,15,16]. Komplex enzym-inhibitor navíc podléhá procesu zvanému stárnutí, tzv. agingu. Jedna z alkoxylových skupin navázaných na fosfor je odštěpena účinkem vody ve formě alkoholu a enzym tak ztrácí svou vnímavost vůči reaktivaci, což má zásadní význam pro léčbu intoxikace OFI. Rychlost stárnutí závisí na době kontaktu enzymu s inhibitem a jeho vlastnostech – je pro jednotlivé sloučeniny různá [7,13].

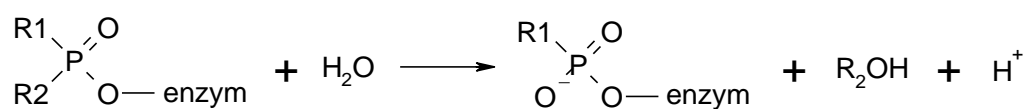


Schéma 2 Aging.[11]

➤ **Intoxikace**

Akutní fáze otravy, tzv. cholinergní krize, se v závislosti na vlastnostech (liposolubilitě, stabilitě komplexu enzym-inhibitor, reaktivovatelnosti), dávce a cestě vstupu OFI do organismu rozvíjí již během expozice nebo několik minut až hodin po ní a může trvat několik dní [32,33]. Podstatou klinického obrazu otravy je nahromadění ACh a nadměrný přenos vzruchů na místech jeho fyziologického účinku. Podle toho, na kterých receptorech se tak děje, se klinické příznaky rozdělují na muskarinové, nikotinové a centrální [7,29,30]. Protože je muskarinový receptor ve srovnání

s nikotinovým vůči ACh značně citlivější, projevuje se otrava zpočátku postižením orgánů inervovaných parasymptikem. Stoupá-li koncentrace ACh dále, jsou drážděny a kontinuálně depolarizovány i nikotinové receptory [10]. Smrt v případě těžkých akutních otrav nastává následkem bronchospazmu nebo paralýzy příčně pruhovaného svalstva (hlavně bránice), popř. u látek s výraznými centrálními účinky následkem centrálního útlumu dechu. Vědomí bývá obvykle dlouho zachované [28,32].

Muskarinové příznaky odráží vystupňovaný účinek nahromaděného acetylcholinu na synapsích VNS, nikotinové příznaky jsou dány kumulací ACh na neuromuskulárních ploténkách motorických nervů a v gangliích. Za normálních podmínek je ACh tak rychle hydrolyzován, že každý stimul spustí jen jeden akční potenciál ve svalovém vlákne. Je-li AChE inhibovaná, vzniká ve svalovém vlákne řada akčních potenciálů, které způsobují větší napětí až křeče svalstva. Některé inhibitory ChE – např. karbamátové inhibitory neostigmin a pyridostigmin ovlivňují spíše neuromuskulární transmisi než autonomní systém, zatímco OFI a karbamátový inhibitor fysostigmin naopak. Této částečné selektivity se s výhodou využívá v terapii [14]. Nepolární OFI snadno prostupují HEB a ovlivňují CNS. Účinky na CNS vyplývají z nerovnováhy mezi cholinergním přenosem nervového vzruchu a ostatními neuromediátorovými systémy. Počáteční excitaci, která může vyústit v křeče, následuje útlum, který může skončit až bezvědomím a selháním dýchání [7,14]. V *Tab. 1* jsou zmiňované příznaky shrnuty.

Opožděná fáze akutní otravy je charakterizována jako období po překonání respirační insuficience a z biochemického hlediska rozvojem nespecifických příznaků, které souvisí s porušenou permeabilitou buněčných membrán, kyslíkovým hladověním tkání a značným energetickým výdejem [5].

Některé OFI mohou způsobovat tzv. pozdní neurotoxické účinky, které nejsou podmíněny inhibicí AChE, nýbrž enzymu NTE. Příznaky – postupné oslabování až ztráta smyslů, svalová slabost, obrny končetin – se objevují 1–2 týdny po expozici a jsou následkem demyelinizace periferních nervů. Vzácně dochází i k poškození bazálních ganglií. Přitom neurotoxicita některých OFI se rozvíjí už při minimálních expozicích, které nezpůsobily ještě žádnou měřitelnou inhibici [14,28,33].

Tab. 1 Tabulka shrnující klinické příznaky intoxikace OFI [24].

MUSKARINOVÉ	GIT	↑ salivace, sekrece, tonus a motilita střev – abdominální křeče, průjmy, zvracení
	močový měchýř	inkontinence moči
	oko	slzení, mióza, pokles nitroočního tlaku
	bronchy	↑ sekrece, bronchokonstrikce, edém
	kůže	pocení
	KVS	bradykardie, hypotenze
NIKOTINOVÉ	kosterní svalstvo vč. respiračních svalů	svalová slabost, paralýza
	ganglia	tachykardie, ↓ tlaku krve
CNS		tremor, neklid, poruchy koncentrace, paměti a spánku, křeče, deprese cirkulace a respirace

➤ Diagnostika a terapie

Stanovení klinické diagnózy otrav způsobených inhibitory ChE je založeno na zhodnocení okolností expozice a symptomů a na stanovení hladin AChE a BuChE. Aktivita těchto enzymů v krvi poměrně přesně odráží stupeň expozice a poškození organismu. Stanovení aktivity AChE v erytrocytech nebo v celé krvi má pro diagnostiku otrav větší význam než stanovení aktivity BuChE v plazmě nebo v séru [7].

Vzhledem k vysoké toxicitě a rychlému nástupu účinku OFI, musí být terapie dostatečně rychlá, radikální a komplexní. Jestliže existuje podezření na otravu způsobenou těmito látkami, je nutné začít léčbu okamžitě a nečekat na laboratorní výsledky [28].

V rámci první pomoci je třeba zabránit další absorpci látky. Při průniku kůží by měl být co nejdříve odstraněn kontaminovaný oděv a exponovaná pokožka důkladně omyta. Při vniknutí jedu do oka je třeba vypláchnout spojivkový vak vodou a vkápnout

1% roztok atropinu. V případě perorálních otrav se provádí laváž žaludku vodou a aktivním uhlím. Osvědčila se též eliminace toxické látky z krve hemoperfuzí [28].

Specifická antidotní farmakoterapie zahrnuje okamžité podání reaktivátoru AChE (kauzální terapie) a atropinu (symptomatická terapie), jejichž účinek se při současném podání potencuje [7,24,28].

Atropin jako kompetitivní antagonist blokuje účinky nahromaděného ACh na periferních i centrálních muskarinových receptorech. V kosterním svalstvu a tedy i bránici převládají receptory nikotinové, kosterní svalstvo tudíž zůstává neovlivněno a paralyzováno. Stejně tak centrální účinky ovlivňuje poměrně málo [24,28]. Dávku a způsob podání určuje závažnost otravy. Celková dávka v několika dnech může dosáhnout i několik stovek mg, aniž by byly pozorovány nežádoucí příznaky, je zde však nebezpečí vzniku fibrilace komor při velké hypoxii, proto je nutné při podávání vysokých dávek zabezpečit i oxygenoterapii. U středně těžkých a těžkých otrav je možné léčbu atropinem doplnit o p.o. podání benaktyzinu (3–5 mg denně), který mírní centrální účinky otravy a příznivě ovlivňuje i její křečovou složku [7].

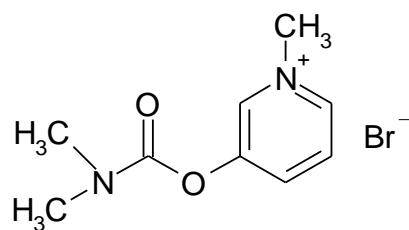
Efektivní dávka reaktivátoru ChE, oximu, musí být podána dostatečně brzy po intoxikaci, dříve než dojde k zestárnutí enzymu, a podávána po dostatečně dlouhou dobu. Při opakovaném podání reaktivátoru se ale musí postupovat opatrněji než u atropinu; laboratorním vyšetřením by se měl nejprve zjistit stav inhibované AChE v testu reaktivovatelnosti (reaktivovatelná či nereaktivovatelná). Není-li laboratorní vyšetření k dispozici, je při opakovaném podání nutné sledovat klinický stav pacienta a při jeho zhoršení další reaktivátor nepodávat [7]. Aktivita BuChE se samovolně obnoví až po syntéze molekul enzymu *de novo* – to trvá přibližně 50 dní, aktivita AChE se zotaví až po nahrazení otrávených buněk novými erytrocyty, tj. až přibližně za 120 dní, jelikož bezjaderné erytrocyty nejsou schopny syntetizovat bílkoviny. Nebezpečné příznaky otravy vymizí však již v okamžiku, kdy se obnoví pouhý zlomek normální enzymové aktivity, při více jak 30% aktivitě AChE nejsou již nikotinové příznaky přítomny [10,24,34].

Kromě specifické terapie je podle potřeby nutné zajistit např. řízené dýchání, farmakologicky podpořit dýchání (i.v. aminofylin), ovlivnit vnitřní prostředí organismu

ve smyslu potlačení acidózy (pufrovací roztok TRIS a NaHCO₃) nebo potlačit centrálně vyvolané křeče tlumícími látkami – např. krátkodobě účinkujícími barbituráty nebo benzodiazepiny [7,10].

➤ **Farmakologická profylaxe otravy (pre-treatment)**

S rozvojem vysoce toxických OFI bylo třeba hledat účinnou profylaxi otrav s cílem chránit jedince, kteří jsou vystaveni zvýšenému riziku intoxikace. Praktického využití dosáhly reverzibilní inhibitory ChE. Nejčastěji používaným je pyridostigmin [7], který reverzibilně karbamoyluje aktivní centrum ChE a tak jej dočasně chrání před irreverzibilní inhibicí. ChE pak postupně spontánně regeneruje. Pyridostigmin se osvědčil v profylaxi otrav způsobených tabunem a somanem, proti GF, sarinu a VX však nemá protektivní účinek téměř žádný [11,30].



pyridostigmin

Protektivní účinek vykazují také pyridiniové oximy – jako reverzibilní inhibitory ChE se vážou na enzym a tak jej chrání před OFI [13].

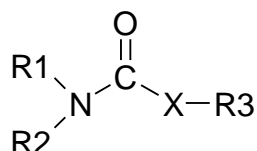
Nejnověji jsou jako potenciální profylaktika testovány bioscavengery – BuChE spolu s BuChE reaktivátory. Bioscavengery mohou být rozděleny do dvou kategorií: stechiometrické (proteiny, které jsou schopny zachytit molekuly inhibitoru) a katalytické (proteiny, které mohou navázat a detoxifikovat molekulu inhibitoru, regenerovat a tak znovu sloužit jako scavenger) [3,4,12].

4.4.2. Karbamátové inhibitory

Karbamátové inhibitory jsou podobně jako OFI vysoce toxické látky. Patří mezi hojně používané a vysoce účinné pesticidy, které se poměrně rychle rozkládají a tudíž se nekumulují v životním prostředí [28,35].

➤ **Struktura**

Z chemického hlediska se jedná o *N*-substituované estery kyseliny karbamové. Až na pár výjimek se jedná o *N*-methyl nebo *N,N*-dimethyl karbamáty; v důležitosti i počtu převažují *N*-methyl deriváty [11,35].



Obecný vzorec karbamátů. X...O nebo S, R1, R2...obvykle methyl nebo H, R3...bazický fenol nebo enol.

➤ **Osud v organismu**

Karbamátové inhibitory s terciárním dusíkem v molekule se dobře vstřebávají, pronikají HEB a mají periferní i centrální cholinergní účinky. Sloučeniny typu kvartérních bazí působí především periferně. V léčbě myasthenia gravis se využívá jejich přímých nikotinových účinků na nervosvalovou ploténku [9]. V organismu jsou enzymaticky hydrolyzovány nespecifickými esterasami a ChE v játrech, metabolity jsou vylučovány prostřednictvím ledvin a jater [28].

➤ **Mechanismus toxického účinku**

Mechanismus toxického účinku v organismu je stejný jako u OFI – dochází ke kompetitivní inhibici aktivity ChE. Hydroxyl aktivního centra enzymu je esterifikován, v tomto případě karbamovou kyselinou. Spontánní regenerace (dekarbamoylace) vzniklého komplexu enzym-karbamát probíhá rychleji než u komplexu enzym-OFI. Pro

kratší trvání účinku (několik minut až hodin) jsou karbamátové inhibitory považovány za reverzibilní inhibitory ChE [11,14].

➤ **Intoxikace**

Klinický obraz intoxikace je podobný jako v případě OFI, proto je velmi obtížné odlišit otravu způsobenou OFI od intoxikace karbamátovými inhibitory. V obou případech jde v mechanismu účinku o inhibici cholinesteras, takže příznaky i průběh intoxikace jsou si velmi podobné [7]. Avšak díky rozdílné afinitě k ChE a spontánní hydrolyze karbamoylovaného enzymu dochází k méně intenzivním symptomům a jejich kratšímu trvání. Akumulace ACh vede opět k muskarinovým, nikotinovým a CNS účinkům, CNS symptomy jsou však minimální. Smrtelné případy jsou vzácné [28].

➤ **Terapie**

Po expozici karbamátovým inhibitorům je důležitá rychlá dekontaminace oděvu, kůže, vlasů a očí a co nejrychlejší podání antidota. Specifickým antidotem je adekvátní dávka i.v., příp. i.m. podaného atropinu. Atropin antagonizuje účinky ACh nahromaděného v orgánech s muskarinovými receptory, ale neúčinkuje proti nikotinovým projevům. Na rozdíl od OFI je pro rychlou spontánní regeneraci podávání ChE reaktivátorů zcela neúčelné, naopak mohou u některých karbamátů oximy inhibici ještě zvyšovat. Hemoperfúze je rovněž neúčinná. Při otravě po p.o.požití je účinná dekontaminace gastrointestinálního traktu [10,28,35].

4.5. Měření aktivity enzymu

Množství enzymu v daném roztoku nebo extraktu tkáně lze stanovit na základě jeho katalytické funkce v příslušné reakci. Ke stanovení aktivity enzymu je nezbytné znát:

- celkovou stechiometrii katalyzované reakce,
- potřebu koenzymů či kofaktorů,
- jednoduchou analytickou metodu, kterou lze sledovat kinetiku reakce.

Pokud je to možné, sleduje se aktivita enzymu v uspořádání, kde pH a teplota je optimální a koncentrace substrátu je nad saturační úroveň, takže enzymová reakce probíhá kinetikou nultého řádu nezávisle na koncentraci substrátu. Za těchto podmínek je rychlost enzymové reakce úměrná pouze koncentraci enzymu. Ve vhodných časových intervalech se stanovuje množství rozloženého substrátu nebo vzniklého produktu. V roce 1961 doporučila Mezinárodní enzymová komise používat mezinárodní jednotku (U), což je množství enzymu katalyzující přeměnu 1 mikromolu substrátu za minutu za standardních podmínek (30 °C, pH optimální, koncentrace substrátu postačující pro saturaci enzymu). Od roku 1973 je komisí doporučená nová jednotka enzymové aktivity zvaná katal (kat). Je to množství katalyzátoru, které urychlí přeměnu 1 molu substrátu za sekundu za standardních podmínek. Pro běžnou praxi se používají její zlomky: mikro a nanokataly, přičemž platí: 1U = 16,67 nkat [36].

4.6. Metody měření aktivity cholinesteras

Pokles aktivity AChE a BuChE je využíván jako indikátor expozice inhibitorům ChE. Aktivita enzymu může být stanovena různými způsoby, které jsou založeny na obecném principu přidání enzymu z různých zdrojů do pufrované reakční směsi a zahájení vlastní reakce přidáním substrátu. Po určité době, popř. kontinuálně, je sledován úbytek nerozloženého substrátu (nativního či arteficiálního), nebo přírůstek reakčních produktů, obojí buď přímo nebo nepřímo [37].

Existuje mnoho metod stanovení aktivity ChE, nejrozšířenější jsou modifikace následujících:

- elektrometrické, při nichž je měřena změna potenciálu, způsobená H^+ ionty kyseliny, uvolňovanými při hydrolýze substrátu,
- titrační, které využívají neutralizace při hydrolýze vznikající kyseliny louhem,
- manometrické, které jsou založeny na měření objemu CO_2 uvolněného z bikarbonátu kyselinou vznikající při hydrolýze substrátu,
- kolorimetrické, které určují změnu zbarvení indikátoru při změně pH, nebo nerozštěpený substrát, popř. štěpné produkty reakce,
- radiometrické metody, využívající značkových substrátů,
- metody jiné, např. polarografické, kalorimetrické, fluorimetrické či enzymatické [37,38].

S velkým množstvím metod souvisí mnoho různých jednotek, ve kterých se aktivita ChE udává. V současnosti jsou výsledky kterékoli z metod vyjádřovány jako procenta normální aktivity (průměrné hodnoty zdravé populace), a tak mohou být mezi sebou porovnávány [39].

Nejčastěji používaný způsob stanovení aktivity ChE (který byl použit i v této práci) je pomocí modifikované spektrofotometrické metody dle Ellmana. Výhodou této metody je specifita reakce, jednoduchost provedení, přístrojová nenáročnost a vysoká citlivost – jde o jednu z nejcitlivějších metod stanovení aktivity AChE i BuChE. Jedná se o kolorimetrickou metodu, jejíž princip spočívá ve štěpení arteficiálních substrátů –

thiocholinových esterů s následnou detekcí SH- skupiny thiocholinu pomocí DTNB. Vzniklé žluté zbarvení 5-thio-2-nitrobenzoátu, jehož intenzita je mírou aktivity ChE, může být změřena pomocí spektrofotometru. 1 mol 5-thio-2-nitrobenzoátu odpovídá hydrolýze 1 molu substrátu [37,38]. (viz Schéma 3)

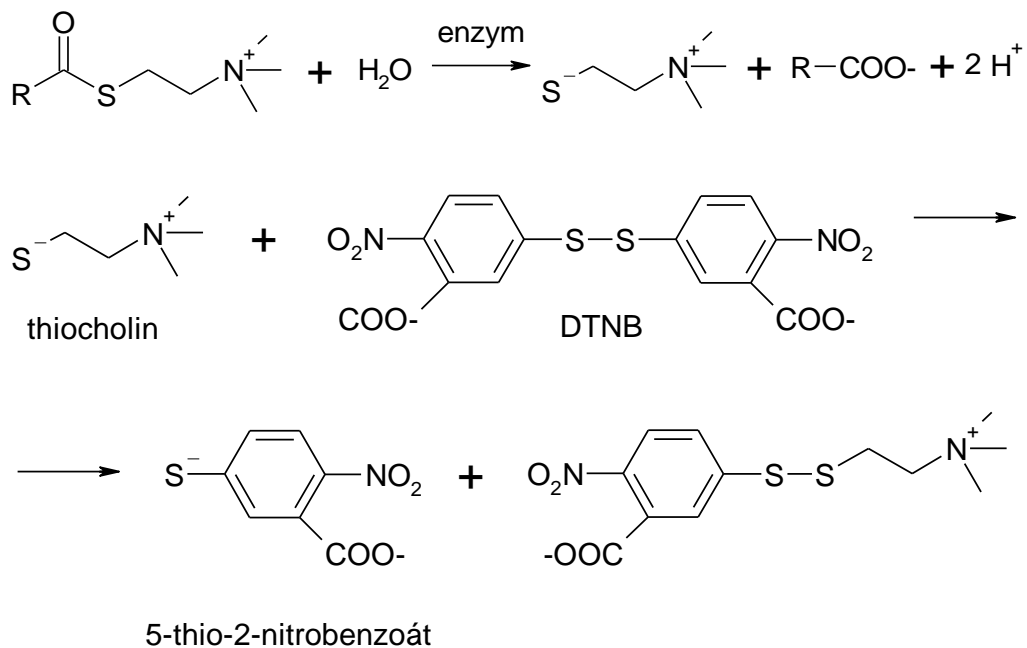


Schéma 3 Estery thiocholinu jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Thiolová skupina thiocholinu se naváže na DTNB; vzniklý anion 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny poskytuje žluté zbarvení [37,38].

4.7. Testování reaktivační účinnosti oximů *in vitro*

Standardní postup testování reaktivační účinnosti oximů *in vitro* zahrnuje inkubaci enzymu s inhibítozem a následné přidání vybraného reaktivátoru o známé koncentraci. Schopnost oximů reaktivovat inhibované ChE může být vyjádřena v % a vypočítána z naměřených hodnot původní aktivity enzymu (A_0), aktivity inhibovaného enzymu (A_i) a aktivity reaktivovaného enzymu (A_R) podle níže uvedené rovnice. Reaktivační účinnost by měla přesahovat 10–20 % [21,40,41].

$$R (\%) = [1 - (A_0 - A_R)/(A_0 - A_i)] \cdot 100$$

5. Praktická část

5.1. Použité chemikálie

- AcThCh-jodid, $\geq 99\%$ (Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- BuThCh-jodid, $\geq 99\%$ (Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- DTNB, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- DDVP, $\geq 95\%$ (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Německo)
- DFP, $\geq 95\%$ (Vojenský technický ústav, Zemianské Kostolany, Slovenská Republika)
- paraoxon, $\geq 95\%$ (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Německo)
- HI-6, $\geq 97\%$ (Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové, ČR)
- methoxim, $\geq 97\%$ (Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové, ČR)
- obidoxim, $\geq 97\%$ (Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové, ČR)
- pralidoxim, $\geq 97\%$ (Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové, ČR)
- trimedoxim, $\geq 97\%$ (Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové, ČR)
- dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema, Brno, ČR)
- dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema, Brno, ČR)
- IPR (Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Triton X-100 (Merck, Německo)
- lidská krev (Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové, ČR)
- destilovaná voda Příprava roztoků (Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové, ČR)

5.2. Příprava roztoků

5.2.1. Příprava PB

- Roztok č. 1 (0,1 M roztok NaH_2PO_4) byl připraven rozpuštěním navážky 15,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ v 1 litru destilované vody.
- Roztok č. 2 (0,1 M roztok Na_2HPO_4) byl připraven rozpuštěním navážky 35,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ v 1 litru destilované vody.
- Roztoky č. 1 a č. 2 byly smíchány v poměru 19:81 tak, aby bylo dosaženo požadovaného pH 7,4.

5.2.2. Příprava vzorků

Pro experimenty bylo použito hemolyzátu lidských erytrocytů jako zdroje AChE a plazmy jako zdroje BuChE.

- Čerstvě odebraná lidská krev byla hemolyzována přidáním 0,01% roztoku tritonu v PB. Aktivita AChE byla upravena naředěním pomocí PB tak, aby změna absorbance (ΔA) při měření podle postupu 5.5.1. byla přibližně 0,2. Vzorek byl uchováván v plastových zkumavkách při teplotě $-30 \text{ }^\circ\text{C}$. V čase potřeby byl připravený roztok enzymu rozmražen, vytemperován na teplotu $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a byla ověřena jeho aktivita podle postupu uvedeného v kap. 5.5.1.
- Lidská plazma byla získána centrifugací plné krve při 5 000 ot./min po dobu 15 minut. Aktivita BuChE byla upravena naředěním pomocí PB tak, aby změna absorbance (ΔA) při měření podle postupu 5.5.1 byla přibližně 0,2. Vzorek byl uchováván v plastových zkumavkách při teplotě $-30 \text{ }^\circ\text{C}$. V čase potřeby byl připravený roztok enzymu rozmražen, vytemperován na teplotu $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a byla ověřena jeho aktivita podle postupu uvedeného v kap. 5.5.1.

5.2.3. Příprava substrátů

- 0,29 g AcThCh-jodidu bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody, po 1 ml rozplněno do mikrozkuvek a zmrazeno při $-30 \text{ }^\circ\text{C}$. Po rozmrazení

a vytemperování na teplotu 25 °C byl obsah 1 mikrozkušavky naředěn destilovanou vodou do konečného objemu 10 ml a tak připraven k použití.

- 0,32 g BuThCh-jodidu bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody, po 1 ml rozplněno do mikrozkušavek a zmrazeno při -30 °C. Po rozmrazení a vytemperování na teplotu 25 °C byl obsah 1 mikrozkušavky naředěn destilovanou vodou do konečného objemu 10 ml a tak připraven k použití.

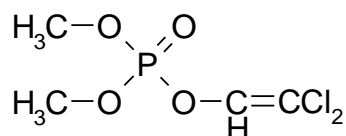
5.2.4. Příprava činidla

0,2 g DTNB bylo rozpuštěno ve 100 ml PB.

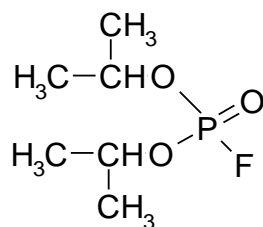
5.2.5. Příprava inhibitoru

Roztok inhibitoru o koncentraci vyvolávající 90% inhibici ChE (podle postupu 5.5.2) byl získán rozpuštěním potřebné navážky v IPR.

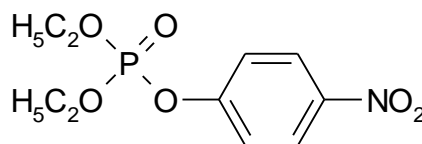
Chemické struktury použitých OFI:



DDVP



DFP

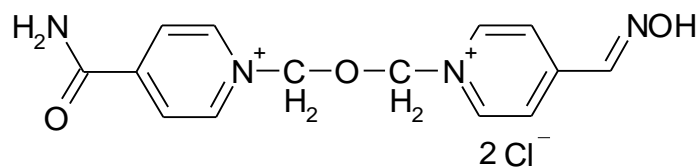


paraoxon

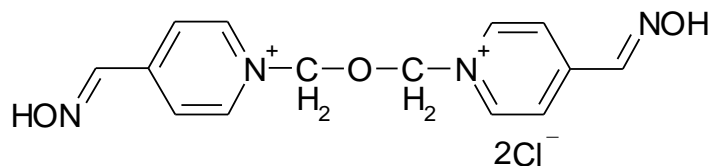
5.2.6. Příprava reaktivátoru

Roztoky reaktivátoru o koncentracích 1 μM a 10 μM byly připraveny rozpuštěním potřebných navážek v destilované vodě.

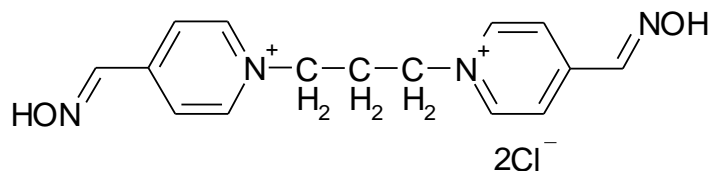
Chemické struktury testovaných reaktivátorů:



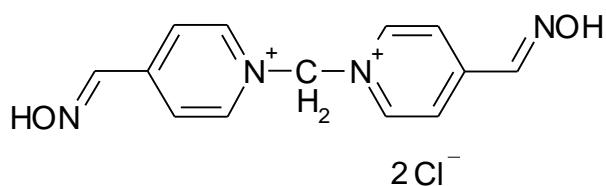
HI-6



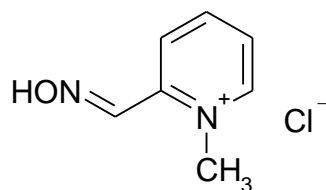
obidoxim



trimedoxim



methoxim



pralidoxim

5.3. Použité přístroje

- analytické váhy (Sartorius, Německo)
- automatické pipety TRANSFERPETTE® (Brand, Německo)
- centrifuga CENTRIFUGE type MPW-340 (Mechanika precyzyjna, Varšava, Polsko)
- pH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)
- jednorázové plastové kyvety PLASTIBRAND® (Brand, Německo)
- UV-spektrofotometr UVIKON 942 (Kontron instruments, Švýcarsko)

5.4. Podmínky měření

Experimenty byly prováděny:

- při teplotě 25 °C
- v prostředí PB,
- při pH 7,4.

5.5. Postupy měření

5.5.1. Měření aktivity enzymu

Stanovení aktivity AChE a BuChE bylo provedeno za použití spektrofotometrické modifikované metody dle Ellmana.

Do kyvety bylo postupně napipetováno:

- 50 µl vzorku,
- 1300 µl PB,

- 25 μl IPR,
- 425 μl DTNB.

Reakce byla zahájena přidáním

- 200 μl substrátu

a promícháním celého obsahu.

Při vlnové délce $\lambda = 412 \text{ nm}$ pro BuChE a $\lambda = 436 \text{ nm}$ pro AChE byla změřena změna absorbance (ΔA) za 1 minutu.

5.5.2. Sledování kinetiky inhibice ChE vybranými organofosforovými inhibitory

U každého inhibitoru (paraoxon, DDVP, DFP) byla experimentálně pro oba enzymy (AChE, BuChE) nalezena taková koncentrace, která snížila jejich aktivitu zhruba o 30 % za dobu 5 minut.

Měření aktivity inhibovaného enzymu bylo provedeno podle následujícího postupu:

Do kyvety bylo postupně napipetováno

- 50 μl vzorku,
- 1300 μl PB,
- 25 μl inhibitoru o zkoušené koncentraci

a po promíchání obsahu bylo inkubováno po dobu 5 minut.

Po inhibici bylo přidáno

- 425 μl DTNB

a reakce byla zahájena přidáním

- 200 μl substrátu.

Obsah kyvety byl opět promíchán a při vlnové délce $\lambda = 412 \text{ nm}$ pro BuChE a $\lambda = 436 \text{ nm}$ pro AChE byla po 1 minutě zaznamenána naměřená hodnota absorbance.

Před každou inhibicí byla změřena výchozí aktivita enzymu podle postupu uvedeného v kap. 5.5.1. s tím rozdílem, že nebyl měřen rozdíl absorbancí, ale absorbance po 1 minutě.

Souběžně bylo provedeno i kontrolní měření se slepým vzorkem, do kterého bylo místo inhibitoru přidáno stejné množství IPR.

Z naměřených hodnot absorbance byla vypočítána procenta aktivity I (%) inhibované AChE a BuChE podle následujícího vztahu:

$$I (\%) = A_I/A_0 \cdot 100$$

A₀...A neinhibovaného enzymu, A_I...A inhibovaného enzymu

U zjištěných koncentrací inhibitorů pak byla podle stejného postupu sledována kinetika inhibice jako klesající aktivita enzymu (%) v čase t, na jejímž základě byly vypočteny hodnoty T_{1/2}.

5.5.3. Stanovení hodnot IC₅₀ zkoušených inhibitorů

Byly připraveny koncentrační řady všech tří inhibitorů – z roztoku o koncentraci 10⁻¹ M bylo pipetou do zkumavky odebráno 200 μl a přidáno 155 μl IPR pro získání 2 ml roztoku o koncentraci 10^{-1,25} M, obdobně 430 μl IPR pro získání koncentrace 10^{-1,5} M, 930 μl IPR pro koncentraci 10^{-1,75} M a 1,8 ml IPR pro získání roztoku inhibitoru o koncentraci 10⁻² M. AChE a BuChE byly inhibovány roztoky o připravených koncentracích inhibitorů a na závěr byla změřena jejich aktivita. Měření aktivity inhibovaného enzymu bylo provedeno podle postupu uvedeného v kap. 5.5.2. s tím rozdílem, že inhibice probíhala po dobu sedminásobku již zjištěných hodnot T_{1/2}.

5.5.4. Testování reaktivační účinnosti vybraných reaktivátorů

Byla testována reaktivační účinnost pralidoximu, methoximu, trimedoximu, obidoximu a HI-6, tj. schopnost reaktivovat AChE a BuChE inhibovanou OFI paraoxon, DDVP a DFP. Pro měření byly použity dvě rozdílné koncentrace

reaktivátoru – 1 μM a 10 μM (výsledné koncentrace v reakční směsi). Tyto koncentrace byly vybrány proto, že jsou dosažitelné *in vivo* v průběhu terapie otrav u lidí, na rozdíl od koncentrací vyšších, které jsou *in vivo* nedosažitelné a navíc často toxické.

Enzym byl inkubován s inhibitorem vhodné koncentrace po dobu $\geq 7 T_{1/2}$. Po inhibici byl k reakční směsi přidán reaktivátor a po 10 minutách byla změřena aktivita enzymu. Vhodná koncentrace inhibitoru je taková, která má za následek přibližně 10% zbytkovou aktivitu enzymu za dobu inhibice $\geq 7 T_{1/2}$.

Měření aktivity reaktivovaného enzymu bylo provedeno podle následujícího postupu:

Do kyvety bylo postupně napipetováno

- 50 μl vzorku,
- 1300 μl PB a
- 25 μl inhibitoru vhodné koncentrace,

promícháno a inkubováno po dobu $\geq 7 T_{1/2}$.

Po inhibici byla zbytková aktivita enzymu okolo 10 %. Následná reaktivace po přidání

- 50 μl reaktivátoru o zkoušené koncentraci (koncentrace v roztoku 1 μM nebo 10 μM) probíhala po dobu 10 minut.

Na závěr bylo přidáno

- 375 μl DTNB
- a 200 μl substrátu.

Obsah kyvety byl promíchán a při vlnové délce $\lambda = 412 \text{ nm}$ pro BuChE a $\lambda = 436 \text{ nm}$ pro AChE byla po 1 minutě zaznamenána naměřená hodnota absorbance.

Před každou inhibicí byla změřena výchozí aktivita enzymu podle postupu uvedeného v kap. 5.5.1. s tím rozdílem, že nebyl měřen rozdíl absorbancí, ale absorbance po 1 minutě.

Souběžně bylo provedeno i kontrolní měření se slepým vzorkem, do kterého bylo místo inhibitoru přidáno stejné množství IPR.

Účinnost reaktivace R vyjádřená v procentech byla vypočtena z naměřených hodnot původní aktivity enzymu (A_0), aktivity inhibovaného enzymu (A_I) a aktivity reaktivovaného enzymu (A_R) podle následující rovnice:

$$R (\%) = [1 - (A_0 - A_R)/(A_0 - A_I)] \cdot 100$$

A_0 byla získána měřením aktivity enzymu podle postupu 5.5.1. s tím rozdílem, že nebyl měřen rozdíl absorbancí, ale absorbance po 1 minutě, A_I měřením aktivity inhibovaného enzymu (viz kap. 5.5.3.) a A_R měřením aktivity reaktivovaného enzymu (viz kap. 5.5.4.).

5.6. Zpracování naměřených dat

Všechna měření byla opakována třikrát.

Pro matematické a grafické zpracování naměřených hodnot byly použity programy Microsoft Excel 2002 a GraphPad Prism version 4 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com.

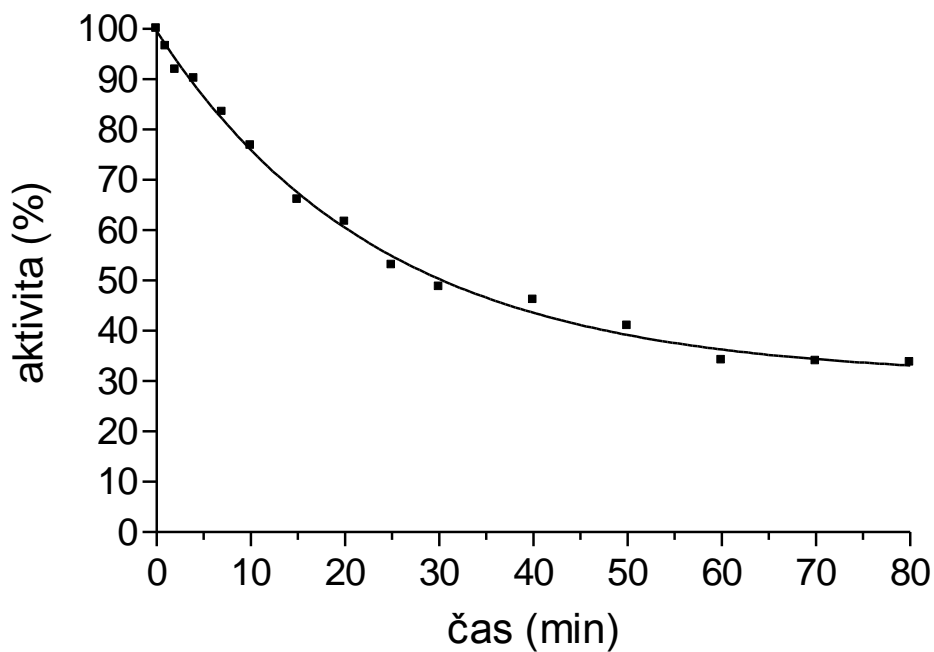
6. Výsledky měření

6.1. Výsledky kinetiky inhibice, zjištěné hodnoty $T_{1/2}$

Na základě naměřených hodnot klesající aktivity AChE a BuChE inhibovaných OFI paraoxon, DDVP a DFP v časech t podle postupu uvedeného v kap. 5.5.2. byly sestaveny tabulky (viz Tab. 2–7) a sestrojeny grafy (viz Graf 1–6), ze kterých byly zjištěny hodnoty $T_{1/2}$ (viz Tab. 8), potřebné pro další měření. $T_{1/2}$ je doba, za kterou je aktivita enzymu snížena na polovinu původní aktivity.

Tab. 2 Naměřené hodnoty klesající aktivity (%) AChE inhibované pesticidem paraoxon v časech t (min).

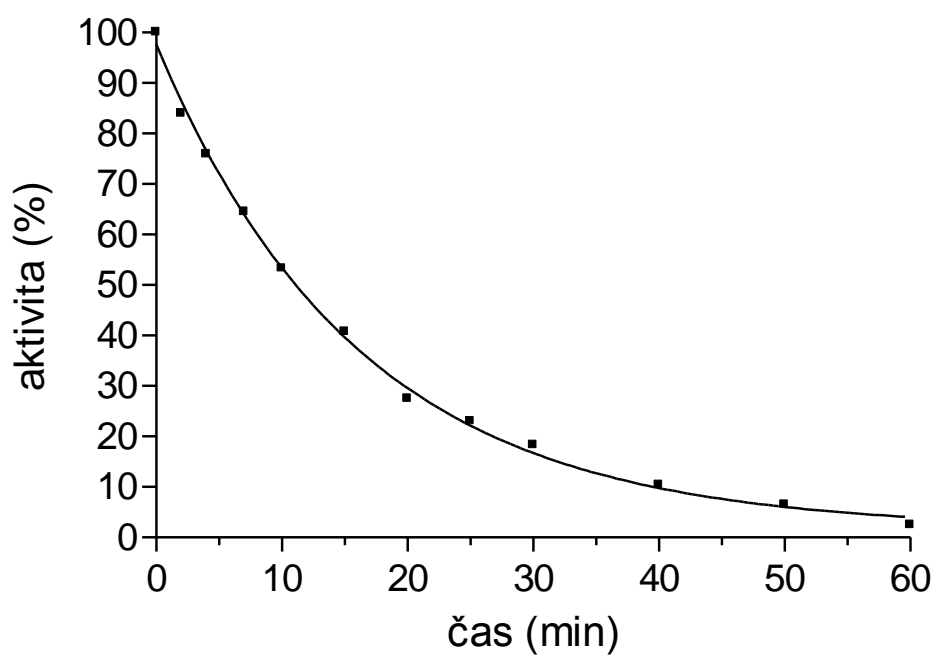
t (min)	aktivita (%)
0	100,00
1	96,56
2	91,84
4	90,10
7	83,48
10	76,75
15	66,00
20	61,65
25	53,07
30	48,68
40	46,13
50	40,93
60	34,11
70	33,95
80	33,74



Graf 1 Graf závislosti aktivity AChE na čase inhibice pesticidem paraoxon.

Tab. 3 Naměřené hodnoty klesající aktivity (%) BuChE inhibované pesticidem paraoxon v časech t (min).

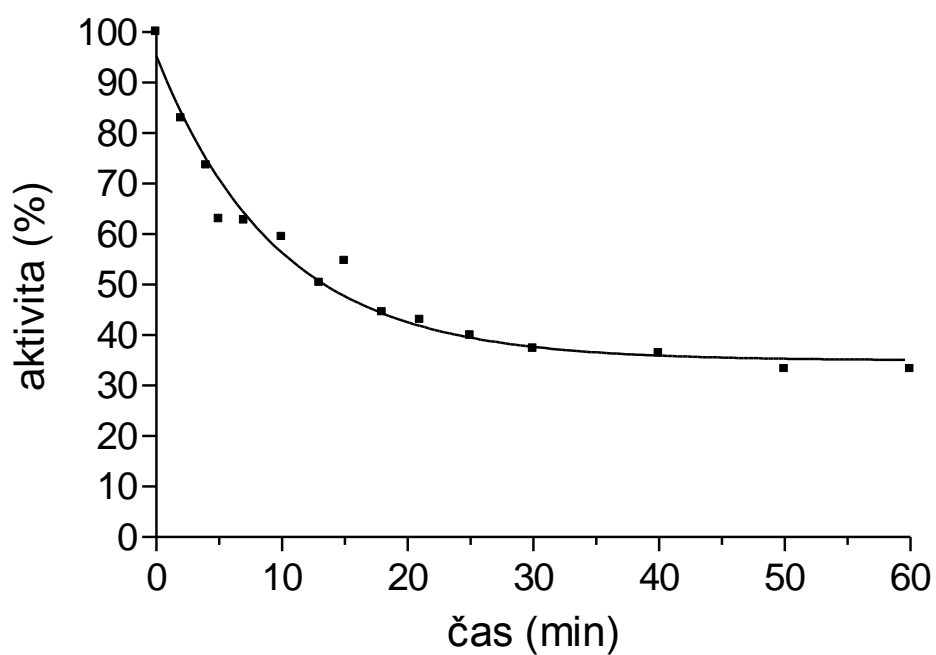
t (min)	aktivita (%)
0	100,00
2	83,93
4	75,87
7	64,48
10	53,22
15	40,70
20	27,42
25	22,96
30	18,28
40	10,36
50	6,44
60	2,48



Graf 2 Graf závislosti aktivity BuChE na čase inhibice pesticidem paraoxon.

Tab. 4 Naměřené hodnoty klesající aktivity (%) AChE inhibované pesticidem DDVP
v časech t (min).

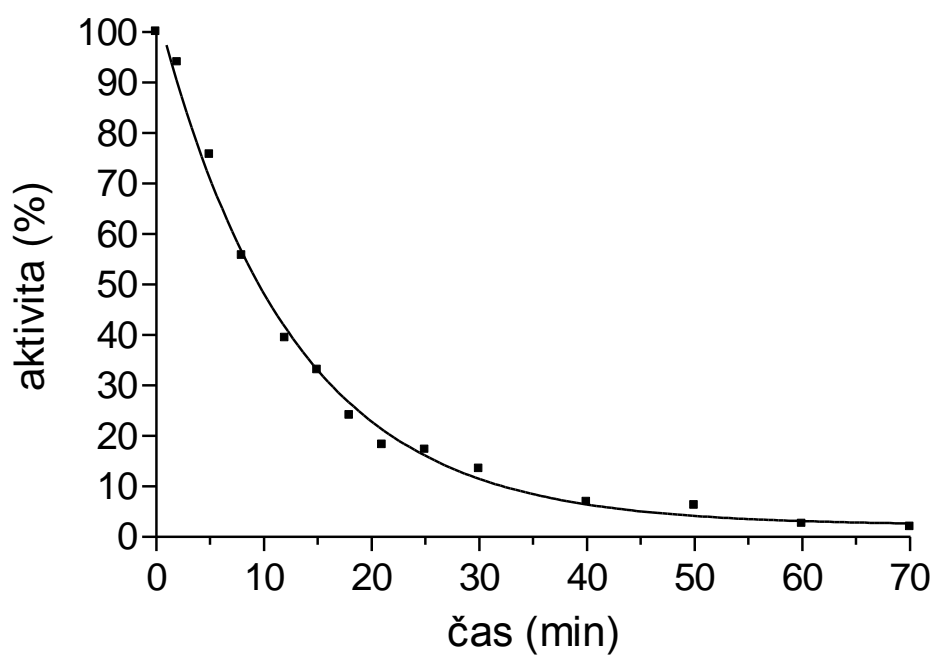
t (min)	aktivita (%)
0	100,00
2	82,87
4	73,57
5	62,92
7	62,68
10	59,36
13	50,33
15	54,65
18	44,42
21	42,96
25	39,91
30	37,32
40	36,39
50	33,20
60	33,20



Graf 3 Graf závislosti aktivity AChE na čase inhibice pesticidem DDVP.

Tab. 5 Naměřené hodnoty klesající aktivity (%) BuChE inhibované pesticidem DDVP v časech t (min).

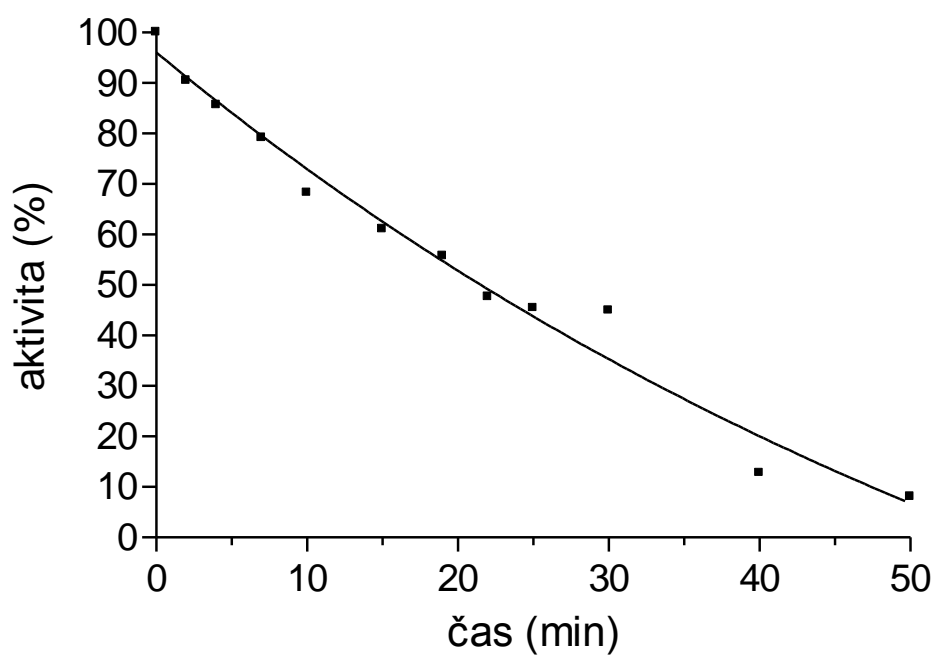
t (min)	aktivita (%)
0	100,00
2	93,94
5	75,69
8	55,70
12	39,37
15	33,04
18	24,00
21	18,21
25	17,22
30	13,49
40	6,85
50	6,20
60	2,50
70	1,92



Graf 4 Graf závislosti aktivity BuChE na čase inhibice pesticidem DDVP.

Tab. 6 Naměřené hodnoty klesající aktivity (%) AChE inhibované látkou DFP v časech
t (min).

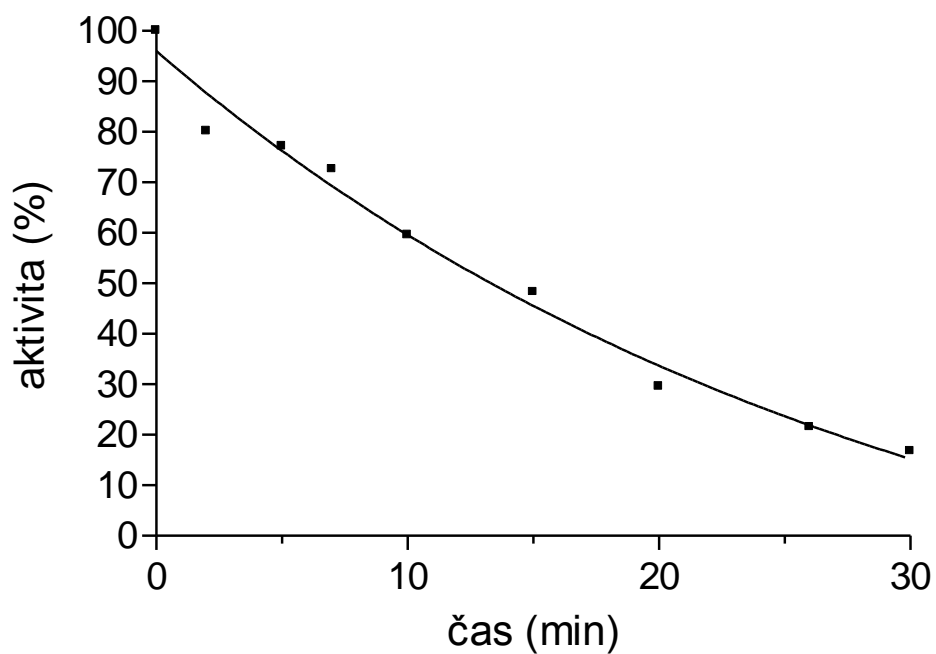
t (min)	aktivita (%)
0	100,00
2	90,46
4	85,61
7	79,12
10	68,17
15	61,06
19	55,70
22	47,63
25	45,37
30	44,87
40	12,70
50	8,01



Graf 5 Graf závislosti aktivity AChE na čase inhibice látkou DFP.

Tab. 7 Naměřené hodnoty klesající aktivity (%) BuChE inhibované látkou DFP v časech t (min).

t (min)	aktivita (%)
0	100,00
2	80,12
5	77,11
7	72,53
10	59,58
15	48,20
20	29,56
26	21,45
30	16,71



Graf 6 Graf závislosti aktivity BuChE na čase inhibice látkou DFP.

Tab. 8 Tabulka vypočítaných hodnot $T_{1/2}$

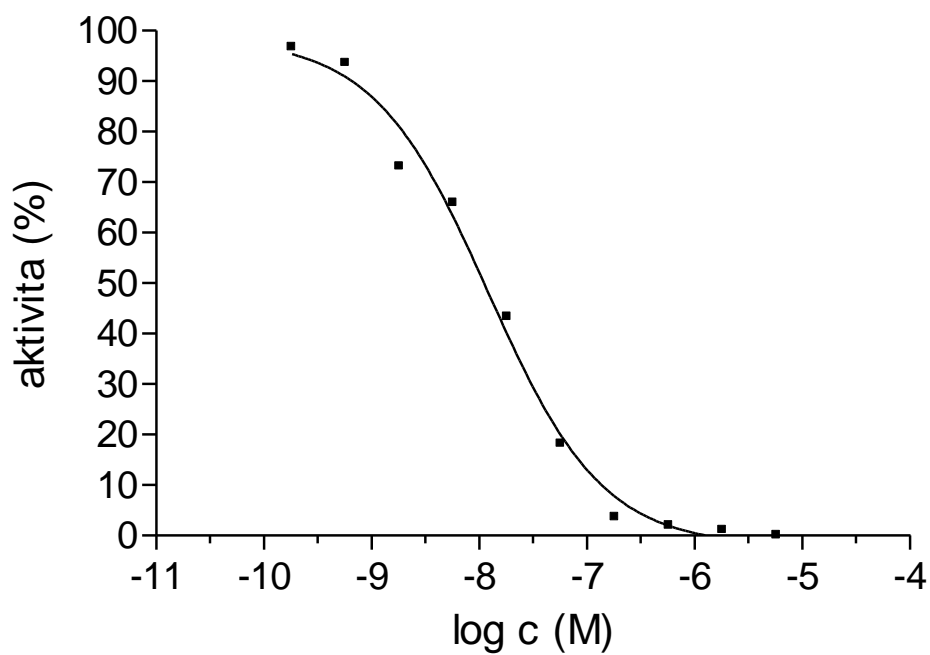
enzym	inhibitor	$T_{1/2}$ (95% CI); (min)
AChE	paraoxon	16,55 (14,63–19,04)
	DDVP	6,99 (5,81–8,79)
	DFP	50,17 (-)
BuChE	paraoxon	11,22 (10,17–12,51)
	DDVP	8,62 (7,63–9,90)
	DFP	20,42 (10,35–32,80)

6.2. Zjištěné hodnoty IC_{50}

Na základě naměřených hodnot podle postupu uvedeného v kap .5.5.3. byly sestaveny tabulky (viz *Tab. 9–14*), sestrojeny grafy závislosti aktivity enzymu na koncentraci inhibitoru (viz *Graf 7–12*) a vypočteny hodnoty IC_{50} . IC_{50} zde představuje koncentraci zkoušeného inhibitoru, která má za následek 50% snížení aktivity enzymu ve vztahu ke kontrolnímu vzorku a slouží k popisu inhibičních vlastností jednotlivých inhibitorů.

Tab. 9 Naměřené hodnoty aktivity AChE (%) inhibované různými koncentracemi
pesticidu paraoxon po dobu $t \geq 120$ min.

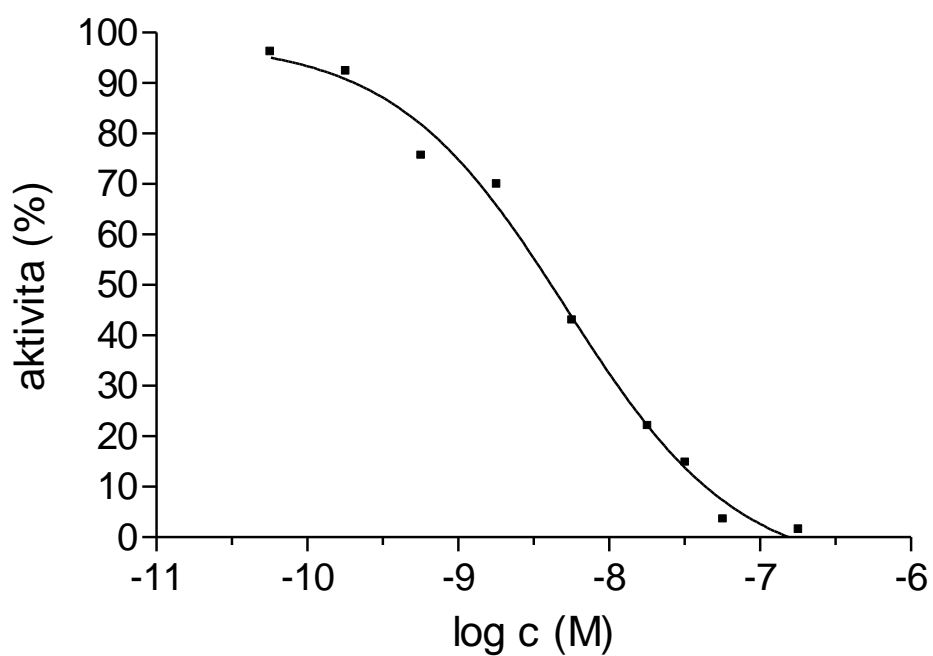
log c (M)	aktivita (%)
-9,74	96,72
-9,24	93,54
-8,74	73,06
-8,24	65,86
-7,74	43,31
-7,24	18,11
-6,74	3,65
-6,24	1,94
-5,74	1,00
-5,24	0,00



Graf 7 Graf závislosti aktivity AChE na koncentraci paraoxonu při inhibici po dobu
 $t \geq 120$ min.

Tab. 10 Naměřené hodnoty aktivity BuChE inhibované různými koncentracemi pesticidu paraoxon po dobu $t \geq 80$ min.

log c (M)	aktivita (%)
-10,24	96,10
-9,74	92,32
-9,24	75,56
-8,74	69,86
-8,24	42,91
-7,74	21,96
-7,49	14,67
-7,24	3,43
-6,74	1,42

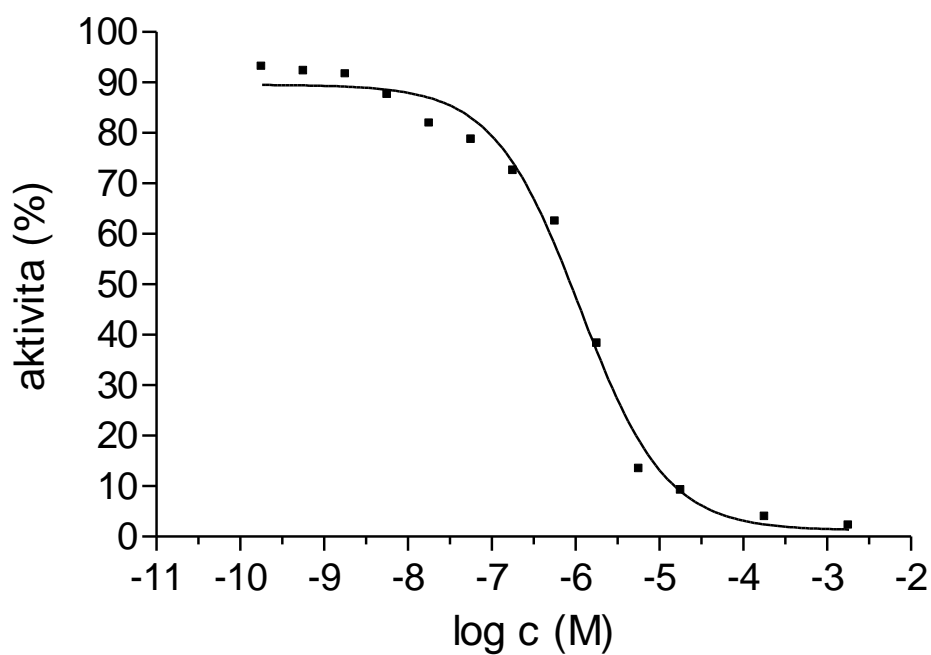


Graf 8 Graf závislosti aktivity BuChE na koncentraci paraoxonu při inhibici po dobu $t \geq 80$ min.

Tab. 11 Naměřené hodnoty aktivity AChE inhibované různými koncentracemi pesticidu

DDVP po dobu $t \geq 50$ min.

log c (M)	aktivita (%)
-9,74	93,02
-9,24	92,17
-8,74	91,55
-8,24	87,52
-7,74	81,78
-7,24	78,64
-6,74	72,44
-6,24	62,39
-5,74	38,20
-5,24	13,40
-4,74	9,14
-3,74	3,90
-2,74	2,16

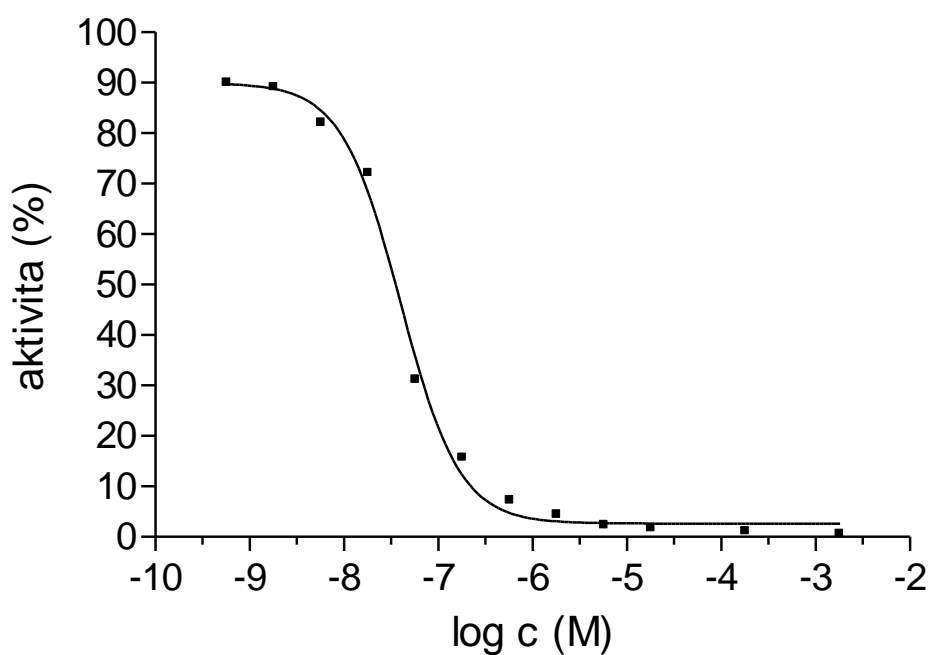


Graf 9 Graf závislosti aktivity AChE na koncentraci DDVP při inhibici po dobu

$t \geq 50$ min.

Tab. 12 Naměřené hodnoty aktivity BuChE inhibované různými koncentracemi
pesticidu DDVP po dobu $t \geq 60$ min.

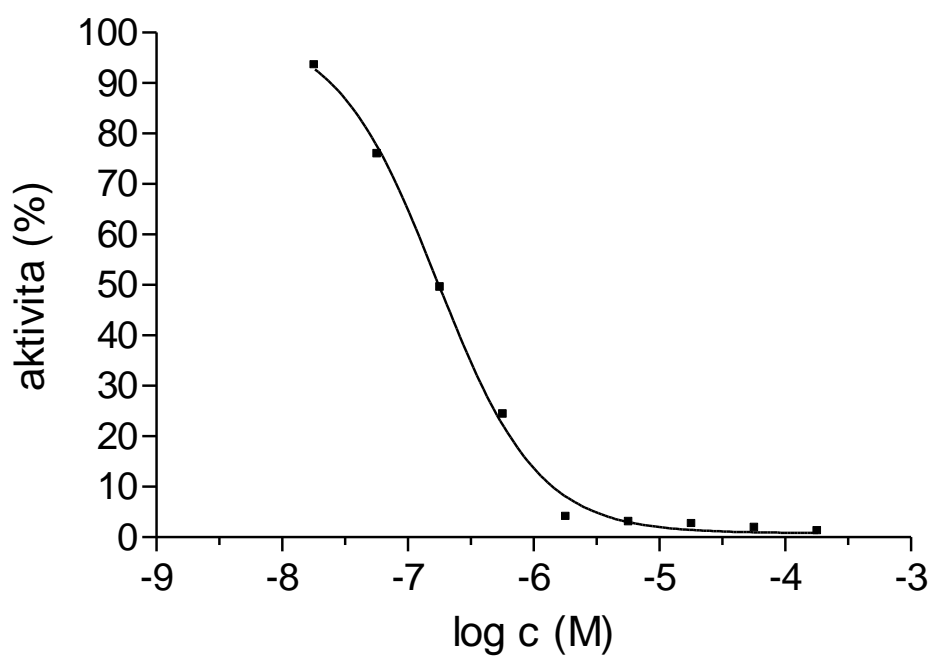
log c (M)	aktivita (%)
-9,24	89,93
-8,74	89,03
-8,24	82,01
-7,74	72,07
-7,24	31,11
-6,74	15,64
-6,24	7,24
-5,74	4,34
-5,24	2,29
-4,74	1,74
-3,74	1,06
-2,74	0,56



Graf 10 Graf závislosti aktivity BuChE na koncentraci DDVP při inhibici po dobu
 $t \geq 60$ min.

Tab. 13 Naměřené hodnoty aktivity AChE inhibované různými koncentracemi látky DFP
po dobu $t \geq 355$ min.

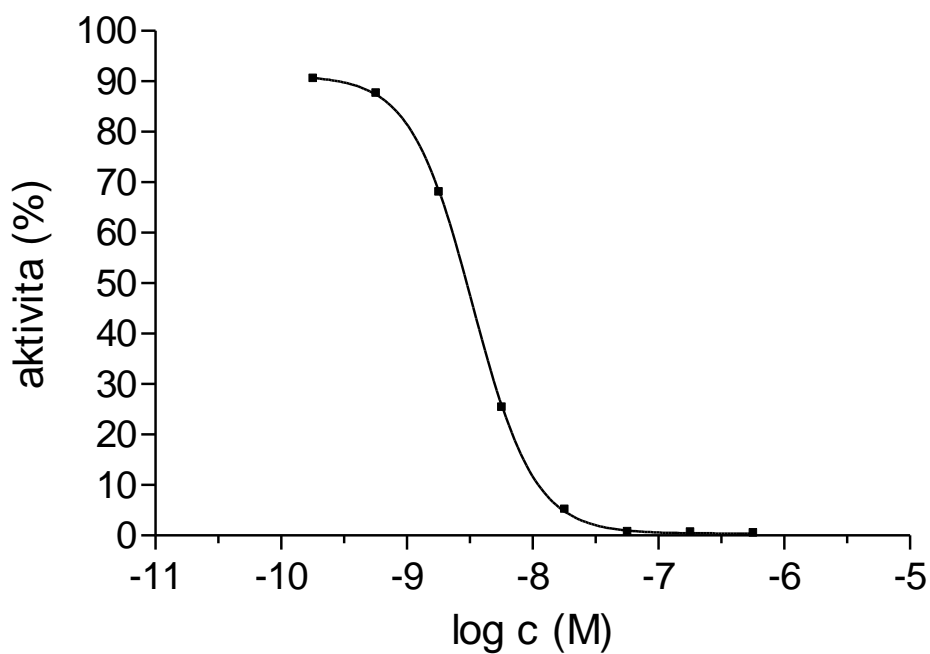
log c (M)	aktivita (%)
-7,74	93,46
-7,24	75,89
-6,74	49,49
-6,24	24,25
-5,74	3,99
-5,24	2,97
-4,74	2,51
-4,24	1,77
-3,74	1,10



Graf 11 Graf závislosti aktivity AChE na koncentraci DFP při inhibici po dobu
 $t \geq 355$ min.

Tab. 14 Naměřené hodnoty aktivity BuChE inhibované různými koncentracemi látky
DFP po dobu $t \geq 145$ min.

log c (M)	aktivita (%)
-9,74	90,47
-9,24	87,50
-8,74	67,93
-8,24	25,32
-7,74	5,00
-7,24	0,66
-6,74	0,52
-6,24	0,39

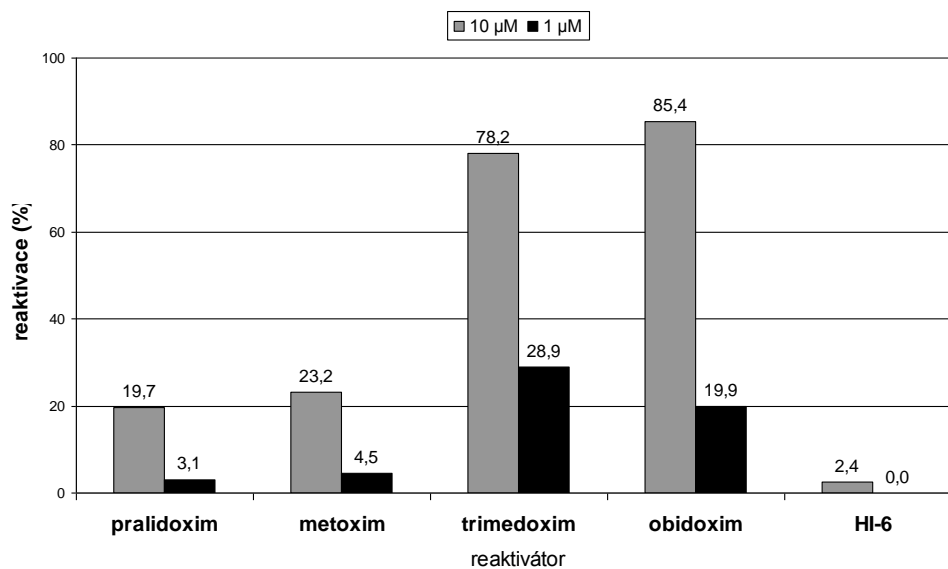


Graf 12 Graf závislosti aktivity BuChE na koncentraci DFP při inhibici po dobu
 $t \geq 145$ min.

Tab. 15 Tabulka vypočítaných hodnot IC_{50} .

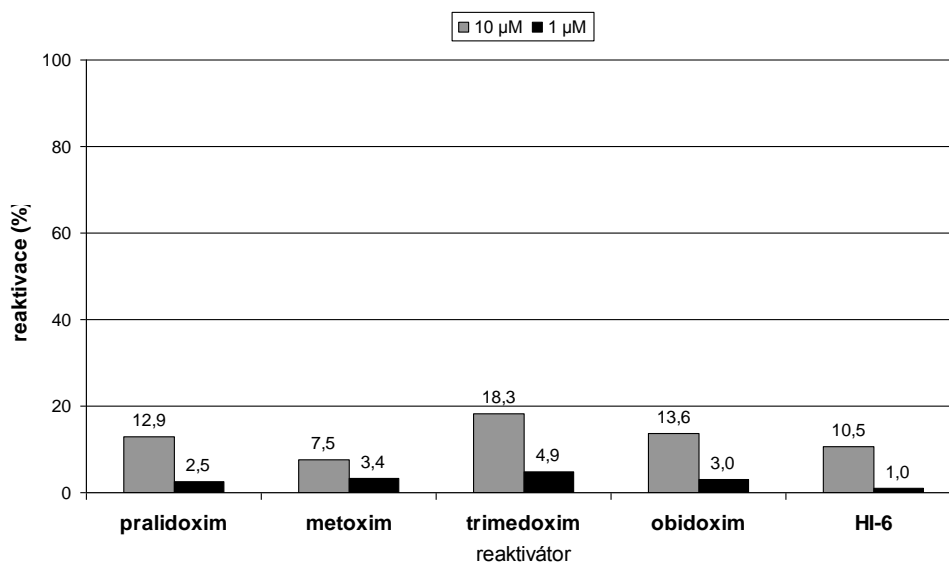
enzym	inhibitor	IC_{50} (95% CI); (M)
AChE	paraoxon	$1,06 \cdot 10^{-8}$ ($8,11 \cdot 10^{-9}$ – $1,39 \cdot 10^{-8}$)
	DDVP	$6,83 \cdot 10^{-7}$ ($4,21 \cdot 10^{-7}$ – $1,11 \cdot 10^{-6}$)
	DFP	$1,79 \cdot 10^{-7}$ ($1,58 \cdot 10^{-7}$ – $2,02 \cdot 10^{-7}$)
BuChE	paraoxon	$3,80 \cdot 10^{-9}$ ($2,89 \cdot 10^{-9}$ – $5,00 \cdot 10^{-9}$)
	DDVP	$3,25 \cdot 10^{-8}$ ($2,47 \cdot 10^{-8}$ – $4,29 \cdot 10^{-8}$)
	DFP	$2,79 \cdot 10^{-9}$ ($2,29 \cdot 10^{-9}$ – $3,40 \cdot 10^{-9}$)

6.3. Výsledky testování reaktivační účinnosti



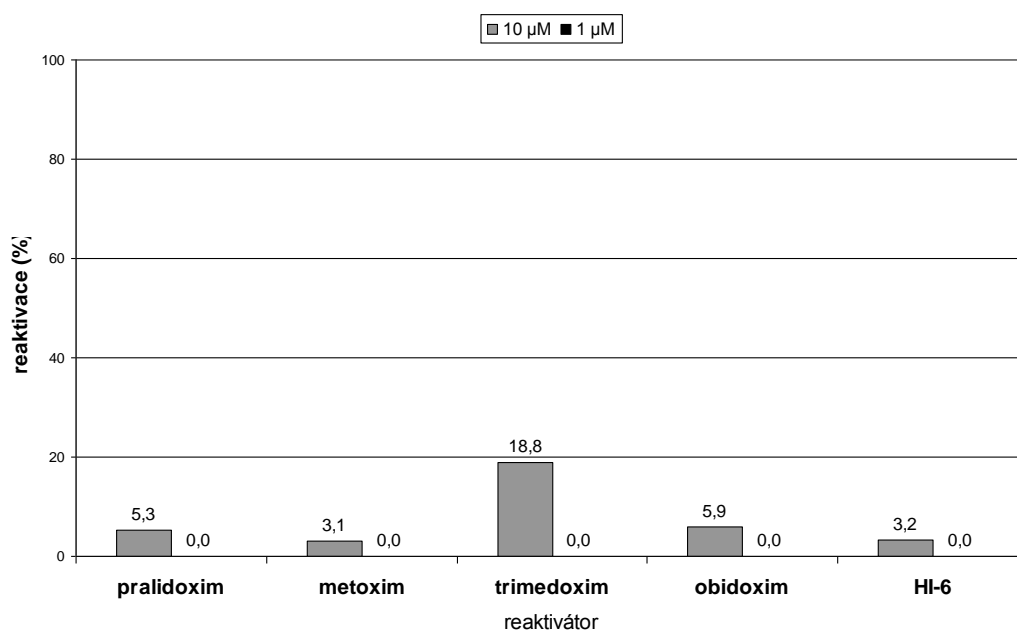
Graf 13 Reaktivační účinnost testovaných oximů o koncentraci 10 µM a 1 µM vůči AChE inhibované paraoxonem.

Jak je z grafu 13 patrné, při koncentraci 10 µM byly jako reaktivátory AChE inhibované pesticidem paraoxon nejúčinnější obidoxim (85,4 %) a trimedoxim (78,2 %), poněkud nižší účinnost vykazoval methoxim (23,2 %) a pralidoxim (19,7 %), oxim HI-6 měl účinnost zanedbatelnou (2,4 %). Nejúčinnějšími reaktivátory v koncentraci 1 µM byly opět trimedoxim (28,9 %) s obidoximem (19,9 %), methoxim (4,5 %) a pralidoxim (3,1 %) měly aktivitu zanedbatelnou, HI-6 nulovou.



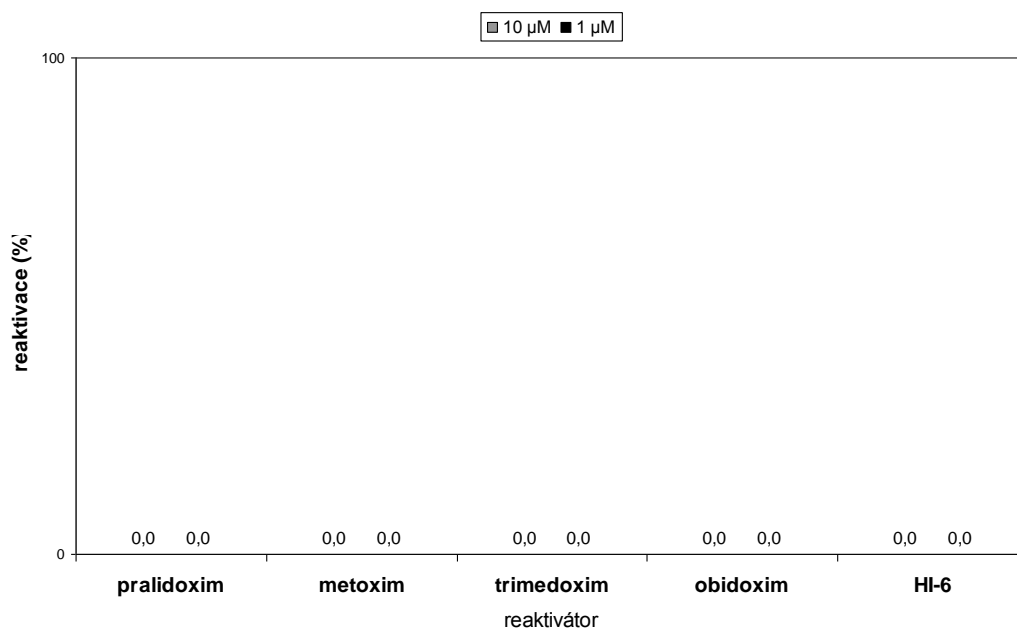
Graf 14 Reaktivační účinnost testovaných oximů o koncentraci 10 µM a 1 µM vůči BuChE inhibované paraoxonem.

Z grafu 14 vyplývá, že nejlepších výsledků v koncentraci 10 µM vůči BuChE inhibované pesticidem paraoxon dosahoval trimedoxim (18,3 %), menší účinnost byla zjištěna u obidoximu (13,6 %), pralidoximu (12,9 %) a HI-6 (10,5 %), nejnižší u methoximu (7,5 %). Při koncentraci 1 µM nejevil žádný z testovaných oximů významnější aktivitu – trimedoxim 4,9 %, methoxim 3,4 %, obidoxim 3,0 %, pralidoxim 2,5 %, HI-6 1,0 %.



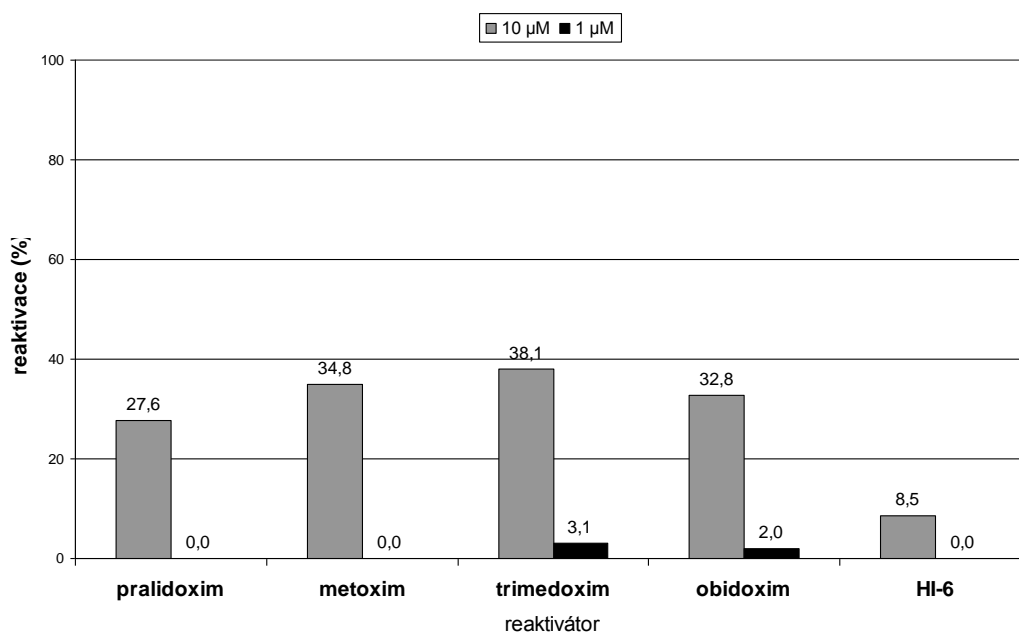
Graf 15 Reaktivační účinnost testovaných oximů o koncentraci 10 µM a 1 µM vůči AChE inhibované DDVP.

Jak můžeme z *grafu 15* vidět, vůči AChE inhibované pesticidem DDVP vykazoval jediný trimedoxim v koncentraci 10 µM aktivitu převyšující 10 % (18,8 %). Reaktivační účinnost všech ostatních oximů byla zanedbatelná – u obidoximu 5,9%, pralidoximu 5,3%, HI-6 3,2% a u methoximu 3,1%. U všech pěti oximů v koncentraci 1 µM byla naměřena nulová reaktivační aktivita.



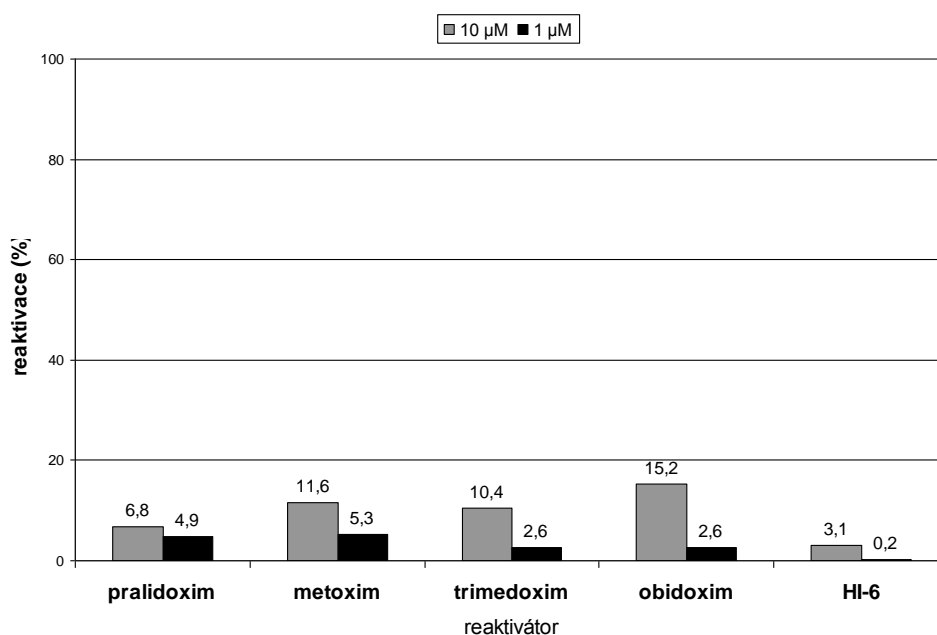
Graf 16 Reaktivační účinnost testovaných oximů o koncentraci 10 μM a 1 μM vůči BuChE inhibované DDVP.

Z Grafu 16 je zřejmé, že vůči BuChE inhibované pesticidem DDVP nebyl žádný z reaktivátorů účinný.



Graf 17 Reaktivační účinnost testovaných oximů o koncentraci 10 µM a 1 µM vůči AChE inhibované DFP.

Z grafu 17 je patrné, že aktivita AChE inhibované látkou DFP byla mimo oxim HI-6, který dosahoval účinnosti pouhých 8,5 %, úspěšně obnovena při koncentraci 10 µM oximy trimedoxim (38,1 %), methoxim (34,8 %), obidoxim (32,8 %) a pralidoxim (27,6 %). Při koncentraci 1 µM měly reaktivátory trimedoxim (3,1 %) a obidoxim (2,0 %) aktivitu minimální, pralidoxim, methoxim a HI-6 nulovou.



Graf 18 Reaktivační účinnost testovaných oximů o koncentraci 10 µM a 1 µM vůči BuChE inhibované DFP.

Jak lze vyčíst z grafu 18, v případě BuChE inhibované látkou DFP se ukázal být v koncentraci 10 µM nejúčinnějším reaktivátorem obidoxim (15,2 %), aktivitu větší než 10 % vykazoval i methoxim (11,6 %) a trimedoxim (10,4 %), pralidoxim však pouhých 6,8 % a oxim HI-6 3,1 %. Reaktivační účinnost všech oximů v koncentraci 1 µM byla zanedbatelná – u methoximu 5,3%, pralidoximu 4,9%, trimedoximu 2,6%, obidoximu 2,6% a HI-6 0,2%.

7. Diskuse a závěr

Se vzrůstajícím rizikem intoxikací organofosforovými a karbamátovými pesticidy a NPL roste i význam výzkumu a vývoje dostatečně účinné profylaxe a terapie otrav, způsobených těmito látkami. Součástí léčby těchto otrav jsou reaktivátory AChE, které jsou schopny její inhibovanou funkci obnovit. K nejčastěji používaným reaktivátorům ChE patří monopyridiniové a bispyridiniové oximy. Reaktiváční aktivita jednotlivých oximů se značně liší, účinnost konkrétního reaktivátoru v antidotní terapii závisí jak na jeho struktuře, tak na struktuře látky, která způsobila intoxikaci, na délce kontaktu enzymu s inhibitorem a rychlosti procesu stárnutí. Reaktiváční účinnost by měla dosahovat minimálně 10–20 %, ale také záleží na výsledné koncentraci v reakční směsi, při které je účinnosti dosaženo –koncentrace 1 μM a 10 μM jsou dosažitelné *in vivo* v průběhu terapie otrav u lidí, na rozdíl od koncentrací vyšších, které jsou *in vivo* nedosažitelné, a navíc často toxické. Ačkoliv se OFI používají již od 2. světové války, dosud neexistuje žádný širokospektrý reaktivátor, který by byl schopen dostatečně reaktivovat ChE inhibované všemi typy inhibitorů. Hledání vhodných reaktivátorů pro otravy způsobené jednotlivými inhibitory, tak i hledání univerzálně účinného reaktivátoru je předmětem mnohých studií.

Cílem této práce bylo popsat a zhodnotit OFI paraoxon, DDVP a DFP z hlediska kinetiky jejich reakce s lidskou erytrocytární AChE a plazmatickou BuChE a určit odpovídající hodnoty IC_{50} , a u pěti nejčastěji používaných reaktivátorů ChE (pralidoxim, methoxim, trimedoxim, obidoxim a HI-6) zjistit a vzájemně porovnat jejich *in vitro* reaktiváční účinnost u erytrocytární AChE a plazmatické BuChE inhibovaných třemi vybranými, výše zmíněnými OFI. Jelikož je obtížné získat klinické doklady o terapeutické účinnosti antidot přímo u pacientů s akutní otravou, jsou poznatky z experimentů prováděných s lidským materiálem *in vitro* cenné a užitečné, ačkoliv nemohou experimenty prováděné *in vivo* plně nahradit.

IC_{50} představující koncentraci zkoušeného inhibitoru, která má za následek 50% snížení aktivity enzymu ve vztahu ke kontrolnímu vzorku, slouží k popisu inhibiční aktivity jednotlivých inhibitorů a odhadu *in vitro* toxicity. $T_{1/2}$ je doba, za kterou je aktivita enzymu snížena na polovinu původní aktivity. Nízké hodnoty IC_{50} a krátký $T_{1/2}$ svědčí o pravděpodobné toxicitě *in vivo*.

Ze zjištěných hodnot IC_{50} (viz Tab. 15) vyplývá, že nejvyšší inhibiční účinnost vůči AChE měl paraoxon, jako druhý DFP, nejméně účinný byl DDVP. Nejvyšší inhibiční aktivitu vzhledem k BuChE měl DFP, nižší paraoxon a nejmenší opět DDVP. Z hlediska kinetiky probíhala nejrychleji reakce AChE i BuChE s DDVP, pomaleji s paraoxonem, nejpomaleji s DFP.

Tab. 16 shrnuje reaktivační účinnost testovaných reaktivátorů vůči AChE a BuChE inhibovaných OFI paraoxon, DDVP a DFP.

AChE		inhibitor		
		paraoxon	DDVP	DFP
reaktivátor	konc. reaktivátoru	reaktivační účinnost (%)		
pralidoxim	10 μ M	19,7	5,3	27,6
	1 μ M	3,1	0,0	0,0
methoxim	10 μ M	23,2	3,1	34,8
	1 μ M	4,5	0,0	0,0
trimedoxim	10 μ M	78,2	18,8	38,1
	1 μ M	28,9	0,0	3,1
obidoxim	10 μ M	85,4	5,9	32,8
	1 μ M	19,9	0,0	2,0
HI-6	10 μ M	2,4	3,2	8,5
	1 μ M	0,0	0,0	0,0
BuChE		inhibitor		
		paraoxon	DDVP	DFP
reaktivátor	konc. reaktivátoru	reaktivační účinnost (%)		
pralidoxim	10 μ M	12,9	0,0	6,8
	1 μ M	2,5	0,0	4,9
methoxim	10 μ M	7,5	0,0	11,6
	1 μ M	3,4	0,0	5,3
trimedoxim	10 μ M	18,3	0,0	10,4
	1 μ M	4,9	0,0	2,6
obidoxim	10 μ M	13,6	0,0	15,2
	1 μ M	3,0	0,0	2,6
HI-6	10 μ M	10,5	0,0	3,1
	1 μ M	1,0	0,0	0,2

Z Tab. 16, která shrnuje dosaženou reaktivační účinnost testovaných reaktivátorů, je patrné následující:

Z reaktivátorů AChE v koncentraci 10 μ M se pro terapii intoxikace paraoxonem jeví jako nejvhodnější látky obidoxim (85,4 %) a trimedoxim (78,2 %), v terapii intoxikace DFP by byly oximy trimedoxim, methoxim, obidoxim a pralidoxim přibližně stejně účinné (okolo 30 %), v případě intoxikace DDVP byla významněji účinná pouze látka trimedoxim (18,8 %).

Z reaktivátorů BuChE neprokázal žádný z oximů významnou účinnost. Pouze v koncentraci 10 μ M přesáhly některé oximy účinnost 10 % – trimedoxim 18,3 %, obidoxim 13,6 %, pralidoxim 12,9 % a HI-6 10,5 % v případě inhibice paraoxonem a obidoxim 15,2 %, metoxim 11,6 % a trimedoxim 10,4 % v případě inhibice DFP.

Vůči inhibici způsobené DDVP vykazovala až na trimedoxim v koncentraci 10 μ M (18,8 %) u AChE většina reaktivátorů zanedbatelnou, nebo ve většině případů nulovou reaktivační účinnost.

Oxim HI-6 je v současnosti považován za nejslibnější širokospektrý reaktivátor ChE, především u otrav NPL je účinnější než dosud používaný pralidoxim a obidoxim, ale u otrav způsobených pesticidy jsou na rozdíl od HI-6 tyto dva reaktivátory dostatečně účinné [42]. Na základě výsledků nebude patrně oxim HI-6 pro reaktivační účely ChE inhibovaných vybranými OFI vhodný, jedině v koncentraci 10 μ M u paraoxonem inhibované BuChE přesáhl mírně 10% účinnost (10,5 %) – tím se jeho neúčinnost v případě otrav způsobených pesticidy potvrdila, u inhibice DFP se reaktivační účinnost také neprokázala.

Oximy v koncentraci 1 μ M nebyly pro reaktivaci AChE ani BuChE vybranými OFI vhodné, s výjimkou trimedoximu (28,9 %) a obidoximu (19,9 %) u paraoxonem inhibované AChE.

Ze získaných výsledků jsou též patrné některé vztahy mezi strukturou reaktivátorů a jejich účinkem, které byly již dříve popsány [1,23] a touto prací opět potvrzeny. Reaktivační účinnost závisí na počtu pyridiniových kruhů, počtu oximových skupin, a např. na délce spojovacího řetězce mezi dvěma pyridiniovými kruhy – biskvartérní oximy často převyšují účinek monokvartérních oximů, sloučeniny

obsahující ve své molekule jen jednu hydroxyiminomethylovou skupinu (pralidoxim, HI-6) vykazují nižší reaktivační účinnost oproti sloučeninám se dvěma takovými skupinami (methoxim, trimedoxim, obidoxim), spojovací řetězec mezi pyridiniovými jádry se třemi jednotkami (např. trimedoxim a obidoxim) bývá výhodnější než řetězec kratší.

Na základě výsledků získaných v této práci je možné konstatovat, že v současnosti používané oximy, které byly s různou účinností schopny reaktivovat AChE inhibovanou vybranými OFI, byly slabými reaktivátory BuChE inhibované těmi samými inhibitory, a proto patrně nebudou testované oximy pro použití jako tzv. pseudokatalytické scavengery vhodné. Tyto poznatky budou využity při hledání optimální terapie otrav způsobených OFI Katedrou toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové, se kterou Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze spolupracuje.

8. Seznam literatury

- [1] Musílek K., Kuča K., Jun D., Doležal M., Hrabínová M. (2005): *Voj. Zdrav. Listy* LXXIV č. 5-6, 184–185.
- [2] Kuča K., Patočka J., Cabal J. (2003): *J. Appl. Biomed.* **1**, 207–211.
- [3] Cerasoli D. M. (2002): *Mil. Psychol.* **14**, 121–143.
- [4] Masson P., Fortier P. L., Albaret Ch., Froment M. F., Burtels C. F., Lockridge O. (1997): *Biochem. J.* **327**, 601–607.
- [5] Silbernagl S., Despopoulos A.: *Atlas fyziologie člověka*. Grada, Praha 2004, 82.
- [6] Murray R. K. et al.: *Harperova biochemie*. H&H, Praha 2002, 781–783.
- [7] Bajgar J., Fusek J., Hrdina V.: *Vojenská toxikologie*. VLA JEP, Hradec Králové 1991, 20–55.
- [8] Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A., Bieger D.: *Barevný atlas farmakologie*. Grada, Praha, 2001, 100.
- [9] Hartl J. a kol.: *Farmaceutická chemie II/1*. Karolinum, Praha 1997, 42–53.
- [10] Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*. Grada, Praha 2004, 573–576.
- [11] Patočka J., Kuča K., Jun D. (2004): *Acta Med.* **47**, 215–228.
- [12] Cokugras N. (2003): *Turk, J. Biochem.* **28**, 54–61.
- [13] Jokanović M., Stojiljković M. P. (2006): *Eur. J. Pharmacol.* **553**, 10–17.
- [14] Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Moore P. K.: *Pharmacology*. Churchill Livingstone, 2003, 155–160.
- [15] Hampl F., Paleček J.: *Farmakochemie*. Vydavatelství VŠCHT, Praha 2002, 185-190.
- [16] Patočka J. (1998): *Chem. Listy* **92**, 1016–1019.
- [17] Silbernagl S., Lang F.: *Atlas patofyziologie člověka*. Grada, Praha 2001, 348.
- [18] VITAMINS – Nutrition and Diagnostics [on-line] (2003) [cit. 11.5.2007].
Dostupné z: <www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_03C.doc>.
- [19] Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Moore P. K.: *Pharmacology*. Churchill Livingstone, 2003, 494–496.

- [20] Gordon R. K., Haigh J. R., Garcia G. E., Feaster S. R., Riel M. A., Lenz D. E., Aisen P. S., Doctor B. P. (2005): *Chem. Biol. Interact.* **157-158**, 239–246.
- [21] Sonkusare S. K., Kaul C. L., Ramarao P. (2005): *Pharmacol. Res.* **51**, 1–17.
- [22] SOLEN – Medical education [on-line] (2004) [cit. 2007-05-11]. Dostupné z: <www.solen.cz/artkey/psy-200403-0013.php>.
- [23] Kuča K., Kassa J. (2004): *Hum. Exp. Toxicol.* **23**, 167–171.
- [24] Thiermann H., Szinicz L., Eyer P., Zilker T., Worek F. (2006): *Toxicol. Lett.* **164**, S10.
- [25] Kuca K., Kassa J. (2004): *Vet. Hum. Toxicol.* **46**, 15–18.
- [26] ARNIKA [on-line] (2007) [cit. 2007-05-11]. Dostupné z: <<http://pesticidy.arnika.org/>>.
- [27] Višňovský P.: Farmakologie látek znečišťujících životní prostředí. Karolinum, Praha 1997, 76-83.
- [28] Vopršalová M., Žáčková P.: Základy toxikologie pro farmaceuty. Karolinum, Praha 2000, 144-152.
- [29] Eyer P., Szinicz L., Thiermann H., Worek F., Zilker T. (2007): *Toxicology* **233**, 108–119.
- [30] Szinicz L., Worek F., Thiermann H., Kehe K., Eckert S., Eyer P. (2007): *Toxicology* **233**, 23–30.
- [31] Thiermann H., Szinicz L., Eyer P., Felgenhauer A., Zilker T., Worek F. (2007): *Toxicology* **233**, 145–154.
- [32] National Pesticide Information Center [on-line] (2007) [cit. 2007-05-11]. Dostupné z: <http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp_ch4.pdf>.
- [33] Shahar E., Bentur Y., Bar-Joseph G., Cahana A., Hershman E. (2005): *Pediatr. Neurol.* **33**, 378–382.
- [34] Pacific Toxicology Laboratories [on-line] (2007) [cit. 2007-05-13]. Dostupné z: <<http://www.pactox.com/library/article.php?articleID=16>>.
- [35] Melnikov N N.: Chemistry of pesticides. Springer-Verlag, New York 1971, 480.
- [36] Veselá J., Szotáková B., Dršata J.: Praktická cvičení z obecné biochemie pro farmaceuty. Karolinum, Praha 2003, 41.

- [37] Bajgar J.: Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza, terapie. Avicenum, Praha 1985, 32–33.
- [38] Bajgar J. (1972): *Voj. Zdrav. Listy* XLI č.2, 78–80.
- [39] Abraham T. Phillip (1995): *Clin. Toxicol.* **17**(7).
- [40] Kuča K., Cabal J. (2004): *Zprav. Voj. Farm.* XIV, 13–16.
- [41] Kuča K., Cabal J. (2003): *Vojenské zdravotnické listy* LXXII č.3, 129–130.
- [42] Kassa J (2002): *J Toxicol Clin Toxicol* **40**, 803–16.

PROBLEMATIKA INHIBICE CHOLINESTERAS VYBRANÝMI ORGANOFOSFOROVÝMI PESTICIDY *IN VITRO*

Helena Lázenská

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,
Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové,
Česká republika.

Cílem této práce bylo popsat a zhodnotit organofosforové inhibitory (OFI) paraoxon, DDVP a DFP z hlediska kinetiky jejich reakce s lidskou erytrocytární acetylcholinesterasou (AChE) a plazmatickou butyrylcholinesterasou (BuChE), určit odpovídající hodnoty IC_{50} , a u pěti vybraných reaktivátorů cholinesteras (pralidoxim, methoxim, trimedoxim, obidoxim a HI-6), používaných jako antidota při otravách nervově paralytickými látkami, organofosforovými a karbamátovými pesticidy, zjistit a vzájemně porovnat jejich *in vitro* reaktivační účinnost u AChE a BuChE inhibovaných vybranými OFI. Experimenty byly prováděny při teplotě 25 °C a v prostředí 0,1 M fosfátového pufru při pH 7,4. Enzymy byly inkubovány s inhibitory o vhodné koncentraci a po takovou dobu, aby bylo docíleno 10% zbytkové aktivity. Následná reaktivace probíhala po dobu 10 minut, koncentrace reaktivátorů v roztoku byla 1 μ M a 10 μ M. Stanovení aktivity enzymů bylo provedeno za použití spektrofotometrické Ellmanovy metody, za použití acetyl- a butyrylthiocholin-jodidu jako substrátů.

Ze zjištěných hodnot IC_{50} vyplývá, že nejvyšší inhibiční účinnost vůči AChE měl paraoxon, jako druhý DFP, nejvyšší inhibiční aktivitu vzhledem k BuChE měl DFP, jako druhý paraoxon. Z hlediska kinetiky probíhala nejrychleji reakce AChE i BuChE s DDVP, nejpomaleji s DFP.

Z výsledků reaktivační účinnosti testovaných oximů vyplývá, že v současnosti používané oximy, které byly s různou účinností schopny reaktivovat AChE inhibovanou vybranými OFI, byly špatnými reaktivátory BuChE –žádný nepřekonal 20% účinnost. Lze tedy říci, že testované oximy patrně nebudou pro profylaktické použití u otrav způsobených paraoxonem, DDVP a DFP jako součást tzv. pseudokatalytického scavengeru vhodné.

QUESTIONS OF THE *IN VITRO* INHIBITION OF CHOLINESTERASES BY SELECTED ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES

Helena Lázenská

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05, Hradec Kralove, Czech Republic.

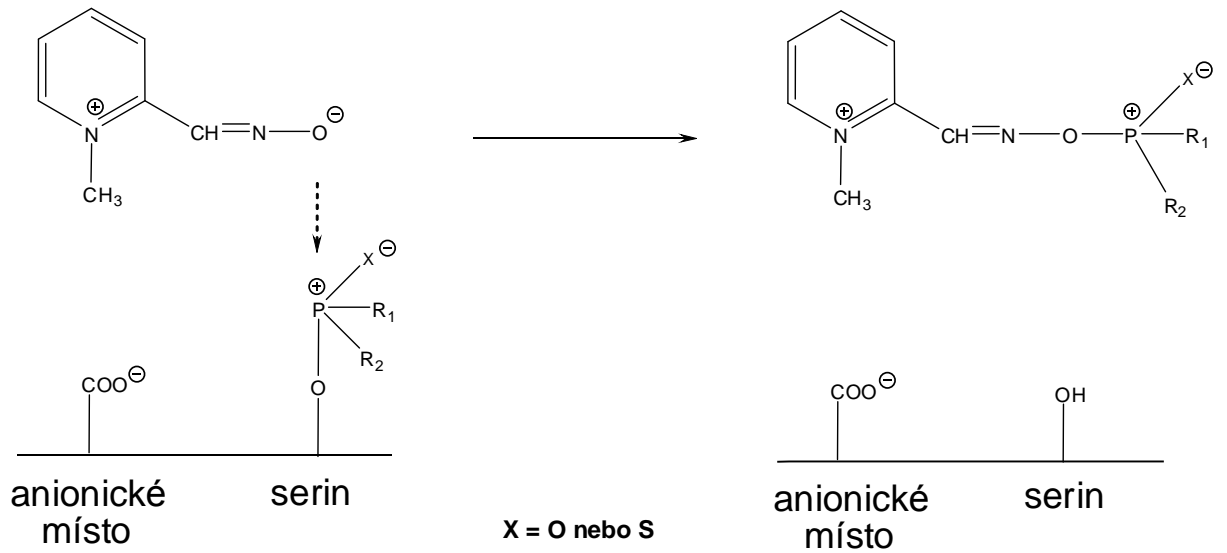
The aim of this study was to describe organophosphorus inhibitors paraoxone, DDVP and DFP from the aspect of the kinetics of their reaction with human erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) and plasma butyrylcholinesterase (BuChE), to find IC_{50} , and to test the *in vitro* potency of five selected oximes (pralidoxime, methoxime, trimedoxime, obidoxime and HI-6) to reactivate AChE and BuChE inhibited by three mentioned organophosphorus inhibitors. The inhibition of AChE and BuChE was performed by incubation with organophosphorus inhibitors at a convenient concentration and such time, that would result in about 90% activity of an enzyme. A solution of a reactivator at a final concentration 1 μ M or 10 μ M was added to an enzyme, after 10 min of reactivation, a solution of a substrate – acetylthiocholine-iodide or butyrylthiocholine-iodide was added, and the activity of an enzyme was measured by the spectrophotometric Ellman's method. The experiment was performed at 25 °C, pH 7,4 and in a 0,1 M phosphate buffer.

According to IC_{50} values, the highest potency to inhibit AChE had paraoxone, the second potent was DFP, the best potency to inhibit BuChE showed DFP, then paraoxone. From the aspect of the kinetics, the fastest reaction of both AChE and BuChE was with DDVP, the slowest with DFP.

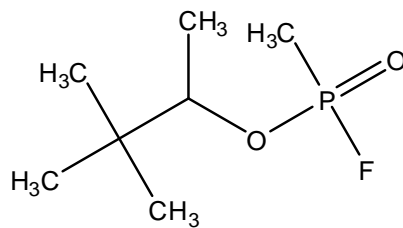
The results of the reactivation potency obtained in this experiment showed that the currently available oximes used for AChE reactivation were of poor activity in case of BuChE reactivation – none reached the activity of 20 %. Due to this, oximes tested in this work as potential pseudocatalytic scavengers, seem to be ineffective in prophylaxis against poisonings caused by paraoxone, DDVP and DFP.

ERRATA

Str. 22, Schéma 1



Str. 25 – soman:



Str. 46 – HI-6:

