

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

---

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Sledování markerů oxidačního stresu po intoxikacích nervově paralytickou látkou a  
podání reaktivátoru acetylcholinesterasy**

**Evaluation of oxidative stress markers after intoxication with nerve agents and  
treatment with acetylcholinesterase reactivators**

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Školitel - specialista: RNDr. Miroslav Pohanka, PhD.

Hradec Králové, 2011

Miroslava Mercová

## **Prohlášení**

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

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického školského výzkumu 263 002: Studium biologicky aktivních látek perspektivních v prevenci a léčbě civilizačních onemocnění.

Hradec Králové, 2011

.....

Podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala především RNDr. Miroslavu Pohankovi, PhD. za odborné vedení, ochotu, vstřícnost a cenné rady a připomínky při zpracování diplomové práce. Mé díky patří i doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za podněty k úpravám a v neposlední řadě Martině Hrabínové za všestrannou pomoc při realizaci experimentální části.

## SEZNAM ZKRATEK

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
ATChCl	acetylthiocholin chlorid
BChE	butyrylcholinesterasa
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FRAP	ferric reducing antioxidant power
FVZ UO	Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
4-HNE	4-hydroxynonenal
MDA	malondialdehyd
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NPL	nervově paralytické látky
PBS	fosfátový pufr
RNS	reactive nitrogen species
RONS	reactive oxygen and nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
SÚJB	Státní úřad pro jadernou bezpečnost
TBA	thiobarbiturová kyselina
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TCA	trichloroactová kyselina
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazin

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>8</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1. OXIDAČNÍ STRES</b> .....	<b>9</b>
3.1.1. <i>VOLNÉ RADIKÁLY</i> .....	9
3.1.1.1. Rozdělení volných radikálů.....	10
3.1.1.2. Přechodné kovy jako volné radikály.....	11
3.1.2. <i>ANTIOXIDAČNÍ OCHRANNÉ SYSTÉMY</i> .....	12
3.1.2.1. Enzymové antioxidanty.....	12
3.1.2.2. Nízkomolekulární antioxidanty.....	14
3.1.2.3. Vysokomolekulární antioxidanty.....	16
3.1.3. <i>POŠKOZENÍ MOLEKUL VOLNÝMI RADIKÁLY</i> .....	16
3.1.4. <i>NEGATIVNÍ A POZITIVNÍ ÚČINKY VOLNÝCH RADIKÁLŮ V ORGANISMU</i> .....	17
3.1.5. <i>CELKOVÁ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA</i> .....	17
3.1.6. <i>MARKERY OXIDAČNÍHO STRESU</i> .....	17
3.1.6.1. Přímá detekce volných radikálů.....	18
3.1.6.2. Měření produktů oxidačního poškození.....	18
3.1.6.3. Měření antioxidantů.....	19
<b>3.2. ACETYLCHOLIN A CHOLINSTERASY</b> .....	<b>20</b>
3.2.1. <i>ACETYLCHOLIN</i> .....	20
3.2.1.1. Syntéza a uvolňování.....	20
3.2.1.2. Receptory pro ACh.....	20
3.2.1.3. Účinky ACh.....	21
3.2.2. <i>CHOLINESTERASY</i> .....	21
3.2.2.1. Butyrylcholinesterasa.....	22
3.2.2.2. Acetylcholinesterasa.....	22
<b>3.3. NERVOVĚ PARALYTICKÉ LÁTKY</b> .....	<b>24</b>
3.3.1. <i>MECHANISMUS PŮSOBENÍ</i> .....	25
3.3.2. <i>PROJEVY INTOXIKACE</i> .....	26
3.3.3. <i>TERAPIE INTOXIKACE</i> .....	26
3.3.3.1. Anticholinergika (funkční antidota).....	26
3.3.3.2. Reaktivátory AChE (kauzální antidota).....	27
3.3.3.3. Antikonvulziva.....	28
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2. POMŮCKY A PŘÍSTROJE</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3. LABORATORNÍ ZVÍŘATA</b> .....	<b>31</b>
<b>4.4. EXPERIMENT IN VIVO</b> .....	<b>31</b>
4.4.1. <i>ÚPRAVA BIOLOGICKÝCH VZORKŮ</i> .....	32
<b>4.5. POUŽITÉ METODY</b> .....	<b>33</b>
4.5.1. <i>THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES (TBARS)</i> .....	33
4.5.2. <i>STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHIONREDUKTASY</i> .....	33
4.5.3. <i>FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP)</i> .....	33
4.5.4. <i>TOTAL PROTEIN</i> .....	34

4.5.5. STANOVENÍ AKTIVITY ACETYLCHOLINESTERASY.....	35
4.6. STATISTICKÁ ANALÝZA.....	35
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>36</b>
5.1. THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES (TBARS).....	36
5.2. STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHIONREDUKTASY .....	37
5.3. FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP).....	38
5.4. KONCENTRACE PROTEINŮ V PLAZMĚ.....	39
5.5. STANOVENÍ AKTIVITY ACETYLCHOLINESTERASY .....	40
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>42</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>46</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>47</b>

# 1. ÚVOD

Radikálové reakce probíhají v živých organismech zcela fyziologicky, jsou esenciální pro aerobní způsob života i pro další naprosto nezbytné děje. Na druhou stranu nerovnováha mezi jejich tvorbou a deaktivací označovaná jako oxidační stres je příčinou řady patologií. Tato problematika se v posledních desetiletích stala velmi perspektivním oborem. Výzkum v oblasti volných radikálů jde kupředu značnou rychlostí a objevují se stále nové teorie prokazující souvislost mezi oxidačním stresem a rozvojem některých onemocnění. Z těchto onemocnění lze jmenovat například aterosklerózu, diabetes mellitus nebo nejčastější formu demence - Alzheimerovu demenci. Řada těchto nemocí označovaná též jako nemoci z volných radikálů bývá také doprovázena oxidačním stresem vyvolanou zánětlivou reakcí. Nový pohled na patogenezi těchto nemocí podněcuje vědce k hledání možností, jak do patogenetických procesů zasáhnout a tím zefektivnit dosavadní léčbu i prevenci.

Přítomnost oxidačního stresu spolu s neuronálním zánětem byla zaznamenána i po intoxikaci organismu organofosfáty. Tyto látky působí jako ireverzibilní inhibitory cholinesteras. Způsobují nahromadění acetylcholinu na nervových synapsích, což se projeví především zvýšenou sekrecí žláz, svalovými záškuby, křečemi, paralýzou svalů včetně dýchacího svalstva. Tyto symptomy mohou vést ve svém konečném důsledku až ke smrti. I přes to, že jsou tyto látky pro člověka vysoce toxické, zkoumá se jejich možné využití v medicíně, například v léčbě Alzheimerovy demence. Uplatnění našly však především ve vojenství. I když je vyvíjena mezinárodní snaha zamezit používání chemických jedů pro vojenské účely, stále zde existuje hrozba jejich zneužití jak v lokálních a celosvětových válečných konfliktech, tak při teroristických útocích. Další oblastí jejich využití je zemědělství, kde se používají jako insekticidy. I zde se setkáváme s otravami těmito látkami většinou v důsledku náhodného pozření či sebevražedného pokusu.

Základem léčby otrav organofosfáty je atropin v kombinaci s oximovým reaktivátorem. Avšak i přes intenzivně probíhající výzkum je tato terapie v mnohém nedostačující. Změny v redoxních parametrech byly zaznamenány i po podání antidot. Avšak bližší popis tohoto jevu a určení jeho významu je otázkou dalšího výzkumu.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo:

- a) stanovení markerů oxidačního stresu po podání somanu, atropinu a vybraných oximových reaktivátorů prostřednictvím několika metodik (TBARS, FRAP, aktivita glutathionreduktasy),
- b) porovnání těchto dat s naměřenou hladinou plazmatických proteinů a aktivitou AChE,
- c) vyhodnocení experimentálních výsledků.



### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1. OXIDAČNÍ STRES

Pod pojmem oxidační stres se rozumí porušení rovnováhy mezi oxidačními a redukčními procesy v živých organismech. Na přítomnosti propracovaného a přísně regulovaného systému oxidačně-redukčních reakcí je založen aerobní metabolismus, i další životně důležité děje. Nadbytek jednoho z procesů může mít však na organismus negativní vliv. Rovnováhu vytváří na jedné straně volné radikály, na straně druhé antioxidační systémy (*Racek, 2003*).

##### 3.1.1. VOLNÉ RADIKÁLY

Volné radikály jsou vysoce reaktivní částice schopné samostatné existence, obsahující ve valenční sféře jeden nebo více nepárových elektronů. Jakožto nestabilní částice mají tendenci napadat ostatní molekuly a elektron do své valenční sféry doplnit. Stabilitu získávají buď při setkání s jiným radikálem, nebo vytržením elektronu z dalších molekul. Původní molekula se tak sama stává volným radikálem a vše ústí v řetězovou reakci. Řetězová reakce je ukončena, setkají-li se dva radikály, obvykle však tehdy, setká-li se radikál s látkou, jejíž radikál je stabilní a může delší dobu přetrvávat (*Racek, 2003*).

Volné radikály mohou vzniknout třemi způsoby:

- přijetím elektronu (redukci),
- ztrátou elektronu (oxidací),
- homolytickým štěpením kovalentní vazby.

Poslední z uvedených způsobů je vysoce energeticky náročný, proto se v živých systémech prakticky neuplatňuje (*Štípek et al., 2000*).

Příčiny vzniku volných radikálů se dají rozdělit na endogenní a exogenní. K exogenním příčinám patří ionizující a UV záření, vysoký obsah škodlivin ve vzduchu, kouření, intoxikace (např. alkoholem), potrava (volné radikály vznikají při tepelné úpravě, drcení, vlivem světla atd.). K endogenním příčinám náleží zejména vznik kyseliny močové (v reakci katalyzované xanthioxidasou, např. při úrazech, nekrotázách), rozpad fagocytů a makrofágů (záněty, popáleniny, septický stav), vznik methemoglobinu, syntéza prostaglandinů, zvýšený metabolismus estrogenů, autooxidace thiolů, hyperglykémie, reperfuze po předchozí ischemii (*Racek, 2003*).

### 3.1.1.1. Rozdělení volných radikálů

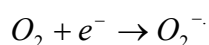
Mezi nejvýznamnější volné radikály patří tzv. reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species). Jedná se o skupinu radikálů, ale i některých reaktivních neradikálových sloučenin, které obsahují v molekule kyslík. Obdobnou skupinu tvoří reaktivní formy dusíku (RNS, reactive nitrogen species). Biochemické dráhy přeměn volných radikálů jsou navzájem úzce propojeny i s antioxidačními systémy (Racek, 2003; Štípek et al., 2000).

Jednotlivé radikály se vzájemně liší stabilitou i významem. Mezi nejvýznamnější patří níže uvedené.

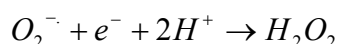
#### ➤ Reactive oxygen species (ROS)

- Superoxid  $O_2^-$

Vzniká z molekuly kyslíku redukcí:



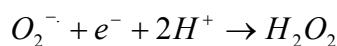
Podléhá dismutaci:



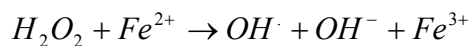
Tato reakce probíhá velmi rychle, v živých systémech je však ještě urychlována enzymem superoxiddismutasou.

- Peroxid vodíku  $H_2O_2$

Vzniká ze superoxidu přijetím jednoho elektronu:



Peroxid vodíku není volným radikálem, je tedy ve srovnání s nimi mnohem méně reaktivní. Nicméně v přítomnosti přechodných kovů ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ ) je schopen reagovat podstatně rychleji za vzniku reaktivnějších radikálů. Významnou reakcí tohoto typu je Fentonova reakce, při které vzniká vysoce toxický hydroxylový radikál:

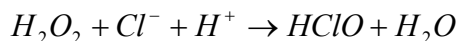


- Hydroxylový radikál  $OH\cdot$

Je nejreaktivnější volný radikál. Kromě Fentonovy reakce může vzniknout i řadou dalších cest.

- Kyselina chlorná  $HClO$

Je syntetizována pomocí enzymu myeloperoxidasy v neutrofilních granulocytech:



Kyselina chlorná je používána polymorfonukleáry jako baktericidní prostředek.

- Singletový kyslík  $^1O_2$

Singletový kyslík je reaktivní forma kyslíku, která vzniká z molekuly kyslíku po přijetí energie. Nepárové elektrony změni své uspořádání v orbitalech nebo svůj spin (Štípek *et al.*, 2000)

#### ➤ Reactive nitrogen species (RNS)

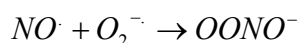
- Oxid dusnatý  $NO\cdot$

Oxid dusnatý obsahuje v molekule nepárový elektron, je tedy volným radikálem. Nicméně radikálovým reakcím většinou nepodléhá. *In vivo* reaguje dostatečně rychle jen s tranzitními kovy a volnými radikály. Metabolity  $NO\cdot$  jsou však velmi reaktivní (Štípek *et al.*, 2000).

Oxid dusnatý je významná fyziologická látka, uplatňuje se v řadě metabolických a signálních funkcí. Je syntetizován složitým procesem z aminokyselin L-argininu a citrulinu prostřednictvím enzymu syntasy oxidu dusnatého (nitric oxide synthase, NOS).

- Peroxynitrit  $OONO^-$

Peroxynitrit není radikál, ale silné oxidační činidlo. Vzniká reakcí oxidu dusnatého se superoxidem:



Jeho toxické účinky spočívají např. v nitraci tyrozinu na 3-nitrotyrozin, čímž poškozují funkci proteinů (Štípek *et al.*, 2000).

#### 3.1.1.2. Přechodné kovy jako volné radikály

Přechodné kovy obsahují ve své valenční sféře nepárové elektrony, chovají se tedy jako volné radikály. Z biogenních prvků mezi ně patří především železo a měď, do organismu se však mohou dostat i jiné přechodné kovy, např. nikl, kobalt, titan aj. Organismus se před nimi chrání několika způsoby:

vazbou kovu v pevném chelátu (např. transportním či skladovacím proteinu), oxidací přechodného kovu na vyšší valenci (*Racek, 2003*).

### 3.1.2. **ANTIOXIDAČNÍ OCHRANNÉ SYSTÉMY**

Ochranné mechanismy vůči volným radikálům se v organismu uplatňují na třech úrovních:

1. Zabránění nadměrného vzniku volných radikálů, např. vazbou iontů přechodných kovů na bílkoviny, regulací aktivity enzymů tvořících volné radikály.
2. Odstranění již vzniklých radikálů, to se uskutečňuje prostřednictvím enzymů (např. superoxiddismutasa) a látek s redukčními účinky (např. vitamin E, vitamin C aj.) (*Racek, 2003*). Jsou označovány jako lapače (trappers), zametače (scavengers) či zhášeče (quenchers) volných radikálů (*Štípek et al., 2000*).
3. Odstranění molekul poškozených volnými radikály reparačními mechanismy, to probíhá na úrovni DNA, proteinů i lipidů prostřednictvím specifických enzymů. Látky, které chrání organismus před volnými radikály, se označují jako antioxidanty. Některé z nich mohou působit více uvedenými mechanismy. Tvoří velmi různorodou skupinu látek, různého významu. Dají se dělit dle různých kritérií (např. dle hydrofility, podle původu či lokalizace). Jednotlivé skupiny se navzájem překrývají. Dle molekulové hmotnosti se antioxidanty dělí na enzymové, nízkomolekulární a vysokomolekulární (*Racek, 2003*). Zde je uveden přehled dle tohoto způsobu dělení.

#### 3.1.2.1. **Enzymové antioxidanty**

- Superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1)  
Tento enzym se vyskytuje v každé buňce aerobních organismů. Katalyzuje dismutaci superoxidu. Dismutace probíhá i spontánně, SOD ji urychluje o 4 řády (*Racek, 2003*). Jsou známy tři druhy tohoto enzymu, liší se kofaktorem, což je vždy atom kovu. Vyskytují se intracelulárně i extracelulárně. Vždy se jedná o zcela jiné molekuly se stejnou katalytickou aktivitou.

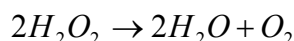
Cu/Zn-SOD - nachází se v cytosolu a v mezimembránovém prostoru mitochondrií

Mn-SOD a Fe-SOD - vyskytují se v prokaryontních organismech a v mitochondriální matrix vyšších eukaryot

Extracelulární SOD (*Racek, 2003; Štípek et al., 2000*)

- Katalasa (CAT, EC 1.11.1.6)

Katalasa je hemoprotein, který se nachází převážně v peroxisomech a na mitochondriální membráně. Katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík:



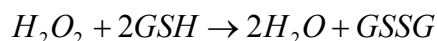
Na rozdíl od peroxidasy rozkládá peroxid vodíku až při vysokých koncentracích (*Racek, 2003*).

- Peroxidasy

Skupina peroxidasy zahrnuje cytosolové enzymy, které redukují peroxid vodíku za současné oxidace dalšího substrátu.

U člověka je tímto enzymem glutathionperoxidasa (GSHPx, EC 1.11.1.9).

Katalyzuje redukci peroxidu vodíku za současné oxidace glutathionu, obsahujícího cystein:



Zpětná regenerace glutathionu probíhá za přítomnosti enzymu glutathionreduktasy (EC 1.6.4.2) dle uvedeného schématu:



GSHPx se vyskytuje ve třech různých formách, které se nacházejí v různých oddílech buňky:

Cytosolová glutathionperoxidasa (cGSHPx)

Extracelulární glutathionperoxidasa

Fosfolipidová glutathionperoxidasa (pGSHPx)

První dvě uvedené obsahují v aktivním centru aminokyselinu selenocystein, pro jejich funkci je tedy důležitý dostatečný přísun selenu do organismu. Fosfolipidová GSHPx redukuje nejen peroxid vodíku, ale i lipidové hydroperoxydy. Je vázána v buněčné membráně, kterou chrání před lipoperoxidací (*Racek, 2003*).

### 3.1.2.2. Nízkomolekulární antioxidanty

- Glutathion (GSH, GSSG)

Glutathion je nejvýznamnější intracelulární neenzymový antioxidant (*Racek, 2003*). Po chemické stránce je to tripeptid  $\gamma$ -glutamylcysteinglycin. Vyskytuje se ve formě redukované jako thiol (GSH) nebo ve formě oxidované jako disulfid (GSSG) (*Racek, 2003*). Jeho posláním je odstraňovat ROS, udržovat v redukované formě sulfhydrylové skupiny proteinů, cysteinu, koenzymu A a regenerovat tokoferol a askorbát (*Štípek et al., 2000*).

S ROS reaguje za vzniku glutathiolového radikálu  $GS^\cdot$ . Glutathiolový radikál  $GS^\cdot$  zaniká reakcí s dalším  $GS^\cdot$  za vzniku GSSG. Může však reagovat s molekulou GSH za vzniku radikálu oxidovaného glutathionu ( $GSSG^\cdot$ ), který je schopen redukovat kyslík na superoxid (*Racek, 2003*). Proto je významná návaznost těchto dějů na aktivitu SOD (*Štípek et al., 2000*). Mimo jiné se glutathion účastní i reakcí katalyzovaných glutathionperoxidasami a glutathion-S-transferasou.

GSH se vyskytuje v buňkách ve vysoké koncentraci (řádově mmol/l), zvláště v erythrocytech. Za běžných okolností převažuje v organismu redukovaná forma GSH. Významným ukazatelem oxidačního stresu je poměr GSH/GSSG, který při silné oxidační zátěži klesá (*Racek, 2003*).

- Kyselina lipoová

Kyselina lipoová je základní součástí dekarboxylačních enzymů  $\alpha$ -ketokyselin. Je schopna regenerovat GSSH a vitamín E (*Grune et al., 2005*). Mechanismus jejího oxidačního působení není dosud zcela popsán (*Štípek et al., 2000*).

- Vitamin C

Funkce vitamínu C jako antioxidantu spočívá především v redukcí volných radikálů a v regeneraci vitamínu E. Askorbylový radikál je obnovován glutathionem. Za určitých okolností je však vitamin C schopen uvolňovat železo z vazby na bílkoviny a redukovat ho zpět na  $Fe^{2+}$ . Tím může dojít k zapojení železa do Fentonovy reakce (*Štípek et al., 2000*).

- **Vitamin E**  
Vitamin E je označení pro směs tokoferolů, z nichž nejaktivnější je  $\alpha$ -tokoferol. Tyto lipofilní látky se uplatňují především jako antioxidanty buněčných membrán a lipoproteinových částic plazmy (Racek, 2003). Z tokoferolu tak vzniká tokoferylový radikál, který je částečně redukován zpět na tokoferol kyselinou askorbovou (Štípek et al., 2000).
- **Kyselina močová**  
Kyselina močová se vyskytuje ve vysoké koncentraci v plazmě, tvoří 35-65 % její antioxidační kapacity (Racek, 2003). Přímo vychytává některé ROS, včetně např. hydroxylového radikálu, singletového kyslíku či ozonu (Grune et al., 2005). Vzniká tak urátový radikál, který je deaktivován z velké části kyselinou askorbovou. Důležitější je však schopnost kyseliny močové vázat ionty železa ve formě pevného chelátu. Tím brání produkci nebezpečného hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí (Racek, 2003).
- **Koenzym Q**  
Pojem koenzym Q zahrnuje skupinu benzochinonů, z nichž nejvýznamnější je koenzym Q<sub>10</sub>. (Racek, 2000). Nachází se na vnitřní membráně mitochondrií, kde se zapojuje do dýchacího řetězce, ale je přítomen i v membránách téměř všech buněk a v lipoproteinech. Je schopný vychytávat produkty lipoperoxidace, společně s tokoferolem (Grune et al., 2005).
- **Karotenoidy**  
Do této skupiny lipofilních látek se řadí např.  $\beta$ -karoten, lutein, lykopen. V antioxidační ochraně se uplatňují především při odstraňování alkylperoxidových radikálů a při zhášení singletového kyslíku (Racek, 2003).
- **Melatonin**  
Působí nejen jako scavenger řady radikálů, ale ovlivňuje i aktivitu a expresi antioxidačních enzymů (Rodriguez et al., 2004).

- Bilirubin

Bilirubin se jako antioxidant uplatňuje především v ochraně před lipoperoxidací a při zhašení singletového kyslíku (*Štípek et al., 2000*).

- Polyfenolické sloučeniny

Struktura polyfenolu je základem flavonoidů, tedy sekundárních metabolitů rostlin, které organismus přijímá potravou. Kromě funkce přímých zhášeců mají schopnost i chelatovat přechodné kovy a inhibovat enzymy katalyzující vznik volných radikálů (*Grune et al., 2005; Racek, 2003*).

### 3.1.2.3. Vysokomolekulární antioxidanty

Do skupiny vysokomolekulárních antioxidantů řadíme proteiny, které vážou přechodné kovy, případně mění jejich oxidační stav, a tím brání jejich zapojení do oxidačních reakcí. Většinou se jedná o transportní nebo zásobní bílkoviny. Železo je v plazmě vázáno na transferin, v buňce na ferritin, v leukocytech na laktoferin. Ceruloplazmin oxiduje železo a váže měď. Vazbu oxidačně nebezpečného hemoglobinu uvolněného z erytrocytů zajišťuje haptoglobin, vazbu volného hemu hemopexin. Roli v antioxidantní ochraně hraje i albumin, metalothioneiny a chaperony (*Racek, 2003; Štípek et al., 2000*).

### 3.1.3. POŠKOZENÍ MOLEKUL VOLNÝMI RADIKÁLY

Oxidačnímu poškození mohou podlehnout lipidy, proteiny i DNA.

Poškození lipidů volnými radikály se označuje jako peroxidace lipidů či lipoperoxidace. Napadeny jsou především nenasyčené vazby v řetězcích mastných kyselin. Rozbíhá se řetězová reakce, jejímiž produkty je směs alkanů a toxické aldehydy - malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxynonenal (4-HNE). Tyto látky jsou pak v praxi velmi často stanovovány jako ukazatele oxidačního poškození buňky. Důsledkem lipoperoxidace je především poškození biomembrán, změna jejich propustnosti a aktivity membránově vázaných enzymů, až zánik buňky (*Racek, 2003; Štípek et al., 2000*).

Při napadení proteinů volnými radikály zpravidla nedochází k řetězové reakci, ale oxidaci, hydroxylaci nebo nitraci zbytků aminokyselin v peptidickém řetězci. Postranní řetězce všech aminokyselinových zbytků v proteinech, zvláště cysteinu a methioninu, jsou citlivé vůči oxidaci působením ROS/RNS. Oxidace cysteinových zbytků může vést k reverzibilní tvorbě smíšených disulfidů mezi thiolovými skupinami proteinů a nízkomolekulárními thioly, zvláště glutathionem (*Valko et al., 2007*). Proteiny jsou napadány i



alkoxylovými a peroxylovými radikály a aldehydy vznikajícími při lipoperoxidaci (Racek, 2003). Následkem je zesíťování proteinů. Proces, při kterém dochází k vazbě karbonylové skupiny na molekulu bílkoviny, se označuje jako karbonylace proteinů a lze ho využít jako ukazatel oxidačního poškození těchto biomolekul (Shulaev a Oliver, 2006). Poškození proteinů může vést ke ztrátě jejich enzymové, signální nebo transportní funkce (Štípek et al., 2000).

V nukleových kyselinách může být poškozena jak ribóza za vzniku malondialdehydu, tak dusíkaté báze. Poškození se projeví zlomy chromosomů, mutagenézí, kancerogenezí či apoptózou (Štípek et al., 2000).

#### **3.1.4. NEGATIVNÍ A POZITIVNÍ ÚČINKY VOLNÝCH RADIKÁLŮ V ORGANISMU**

Volné radikály vznikají při funkci řady enzymů - např. cytochromoxidasy dýchacího řetězce, monooxygenas uplatňujících se při syntéze cholesterolu a metabolismu xenobiotik. Radikálové reakce jsou prostředkem odstraňování bakterií a cizorodých těles fagocyty, uplatňují se při tvorbě hormonů štítné žlázy a oplodnění vajíčka spermií, působí i jako signální molekuly.

Naproti tomu mohou být volné radikály příčinou řady patologií. Jako příklady lze uvést aterosklerózu, diabetes mellitus, neurodegenerativní a zánětlivá onemocnění, karcinomy a stárnutí. Někdy vznik onemocnění přímo vyvolávají, jindy zhoršují či komplikují jeho průběh. Patologické procesy, ve kterých sehrávají volné radikály zásadní úlohu, se označují jako nemoci z volných radikálů (Racek, 2003).

#### **3.1.5. CELKOVÁ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA**

Pojem celková antioxidační kapacita představuje souhrn všech látek s antioxidačním účinkem v plazmě, resp. v extracelulární tekutině. Ukazuje se, že při onemocněních s prokazatelně zvýšenou hladinou volných radikálů, se celková antioxidační kapacita také zvyšuje. Příčina se vysvětluje tím, že organismus reaguje na zvýšení volných radikálů zvýšenou tvorbou antioxidantů, nebo že tyto antioxidanty nejsou schopny vznikající radikály neutralizovat. Dalším možným vysvětlením je vyplavení antioxidantů z jater a tukových depot (Racek, 2003).

#### **3.1.6. MARKERY OXIDAČNÍHO STRESU**

Stanovení hladin volných radikálů v živých systémech je dosti problematické. Důvodem je nejen to, že volné radikály jsou částice velmi reaktivní, tedy s velmi krátkou

dobou existence, ale i skutečnost, že jsou často metabolizovány (vznikají a zanikají) v buněčných kompartmentech, což vyžaduje náročnější analytické metody.

K měření oxidačního stresu se tedy málokdy využívají metody přímé, hojnější je použití metod, které měří produkty radikálových reakcí v organismu (*Shulaev a Oliver, 2006; Štípek et al., 2000*).

### **3.1.6.1. Přímá detekce volných radikálů**

Jednou z nejvýznamnějších metod přímého stanovení volných radikálů je nukleární paramagnetická (spinová) rezonance. Je založena na interakci elektromagnetického vlnění s elektrony měřené látky. Často využívá tzv. spin trapping, kdy se ke vzorku přidají sloučeniny, které reagují s volnými radikály za vzniku méně reaktivních produktů, které se snadněji detekují.

Z dalších postupů se nejčastěji využívá přímá či nepřímá spektrofotometrie (*Štípek et al., 2000*).

### **3.1.6.2. Měření produktů oxidačního poškození**

Většina těchto metodik je založena na reakci produktu oxidačního poškození se specifickou sloučeninou za vzniku barevného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky nebo pomocí HPLC. Jako produkty oxidačního poškození se v případě lipidů nejčastěji stanovují MDA, 4-HNE, F-2-izoprostany, konjugované dieny nebo hydroperoxydy. U proteinů jako ukazatel oxidačního poškození slouží např. karbonylové skupiny nebo nitrotyrozin. U DNA můžeme detekovat oxidačně modifikované nukleosidy, především 8-hydroxy-2-deoxyguanosin a 8-hydroxyguanosin, které jsou navíc z organismu odstraňovány močí a lze je snadno prokázat i v plazmě (*Štípek et al., 2000*).

Nejrozšířenějšími metodami je sledování poškození lipidů. RONS způsobují peroxidaci lipidů za vzniku  $\alpha,\beta$ -nenasycených aldehydů jako jsou 4-HNE a MDA. Tyto aldehydické sekundární produkty lipoperoxidace jsou obecně uznávanými markery oxidačního stresu.

Příkladem je metoda TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) - látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou. Je založena na reakci malondialdehydu s thiobarbiturovou kyselinou a následnou spektrofotometrickou detekcí vzniklého produktu. Výsledky jednoduché metody TBARS by měly být interpretovány s opatrností, protože bylo prokázáno, že v mnoha případech látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou nemusí být spojeny s lipoperoxidací (*Shulaev a Oliver, 2006*).

Ze speciálních metod lze uvést fluorescenční detekci či imunochemické stanovení autoprotilátek proti oxidačně modifikovaným biomolekulám (ELISA). K měření poškozené DNA se využívá kometový test (*Štípek, 2000*).

### **3.1.6.3. Měření antioxidantů**

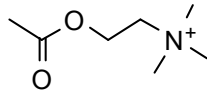
Stanovení hladiny antioxidantů je založeno většinou na podobných principech jako měření produktů oxidačního stresu. Praktický význam má stanovení neenzymových antioxidantů (glutathion, vitamin C, karotenoidy) i enzymových (SOD, GSPHx). U enzymů se často využívá stanovení jejich aktivity (*Štípek et al., 2000*).

## 3.2. ACETYLCHOLIN A CHOLINSTERASY

### 3.2.1. ACETYLCHOLIN

Acetylcholin (ACh) je významným mediátorem periferního i centrálního nervového systému. Zprostředkovává přenos signálu na vegetativních gangliích sympatiku i parasympatiku, na efektech parasympatiku, na potních žlázách sympatiku, v dřeni nadledvin, na nervosvalové ploténce a v CNS (*Lincová et al., 2007*).

- Acetylcholin



#### 3.2.1.1. Syntéza a uvolňování

Molekula ACh je syntetizována z cholinu a acetylCoA. AcetylCoA je tvořen v mitochondriích neuronů, cholin je přijímán z okolí - částečně pochází z rozkladu ACh, částečně je vychytáván z plazmy. Reakce probíhá v cytoplazmě a je katalyzována vysoce specifickým enzymem cholinacetyltransferasou.

ACh je skladován ve vezikulech, extravezikulárně se vyskytuje jen velmi malá část. Vlivem influxu  $Ca^{2+}$  do neuronu při přenosu akčního potenciálu vezikuly fúzí s presynaptickou membránou a mediátor se uvolňuje do synaptické štěrby. ACh stimuluje postsynaptické i presynaptické receptory (tzv. autoreceptory). Následně je velmi rychle (do 1 ms) uvolňován z vazby na receptor a odbouráván prostřednictvím cholinesteras (*Lincová et al., 2007*).

#### 3.2.1.2. Receptory pro ACh

Účinky ACh jsou zprostředkovány jeho interakcí s receptory. Rozlišují se dva základní typy receptorů: muskarinové (M)-receptory a nikotinové (N)-receptory, které se liší stavbou receptorových proteinů. Působí na ně tedy rozdílné typy substrátů (*Lüllmann et al., 2002*). Tyto receptory se dále dělí do několika subtypů s charakteristickým místem výskytu.

Nikotinové receptory:

neuronální  $N_N$  - postsynaptická membrána vegetativních ganglií

muskulární  $N_M$  - nervosvalová ploténka

Muskarinové receptory:

$M_1$  (neuronální) - CNS, periferní neurony, parietální buňky žaludku

$M_2$  (kardiální) - srdce, neuronální tkáň

M<sub>3</sub> (žlázové/hladkosvalové) - žlázy, hladké svaly

M<sub>4</sub> - žlázy, CNS, není přesně objasněno

M<sub>5</sub> - není přesně objasněno

Všechny typy nikotinových receptorů jsou iontovými kanály a jsou selektivně blokovány jinými antagonisty. Muskarinové receptory patří do rodiny receptorů spojených s G-proteiny, konkrétně M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> a M<sub>3</sub> k podtypu G<sub>(q/11)</sub> a M<sub>2</sub> a M<sub>4</sub> k podtypu G<sub>(i)</sub> (Lincová et al., 2007).

Acetylcholin však není jen součást periferního a centrálního nervového systému, výzkumy ukazují, že se jedná o všudypřítomnou molekulu podílející se na regulaci dalších dějů, jako je např. buněčný růst nebo apoptóza (Reinaldo et al., 2009).

### 3.2.1.3. Účinky ACh

Vliv cholinergní inervace na jednotlivé orgány a orgánové systémy shrnuje následující tabulka (Lincová et al., 2006, Lüllmann et al., 2002):

Místo působení	Účinek
Srdce	Negativně inotropní, negativně chronotropní, negativně dromotropní, negativně bathmotropní
Cévy	Vazodilatace
Respirační systém	Bronchokonstrikce, zvýšená sekrece bronchiálních žláz
Gastrointestinální a urogenitální trakt	Zvýšení tonu a motility hladké svaloviny, snížení tonu sfinkterů, zvýšení sekrece žláz
Oko	Mióza, snížení nitroočního tlaku, akomodace na blízko
Slinné, slzné a potní žlázy	Zvýšená sekrece
Nervosvalová ploténka	Zvýšení svalového tonu
CNS	Procesy spojené s učením a pamětí, řízení spánku a probuzení, motorická činnost

### 3.2.2. CHOLINESTERASY

Cholinesterasy jsou enzymy, které štěpí estery cholinu. Do této skupiny patří dva enzymy – acetylcholinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7, označovaná též jako pravá AChE) a

butyrylcholinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8, známá i pod názvy pseudocholinesterasa nebo plazmatická cholinesterasa). Jedná se o serinové hydrolasy. Liší se místem výskytu a specifitou účinku (*Delfino et al., 2009, Patočka et al., 2004b*).

### 3.2.2.1. Butyrylcholinesterasa

BChE vykazuje nižší substrátovou specifitu. Přednostně rozkládá butyrylcholin, může však rozkládat i jiné substráty, včetně ACh (*Lincová et al., 2007*). Je přítomna v plazmě, játrech, hladké svalovině, tenkém střevě, pankreatu, srdci a bílé hmotě mozku. Funkce tohoto enzymu není dosud dostatečně objasněna. Ukazuje se, že BChE hraje roli v rozvoji Alzheimerovy demence, v metabolizaci některých látek (např. sukcinylcholin, prokain, kokain), při otravách organofosfáty a působí jako aktivační enzym některých molekul (např. bambuterol, heroin) (*Patočka et al. 2004b*).

### 3.2.2.2. Acetylcholinesterasa

AChE rozkládá převážně ACh uvolněný do synaptické štěrbině a cytoplazmatický ACh (*Lincová et al., 2007*). Nachází se v erytrocytech, nervových zakončeních, plicích, slezině a ve všech částech mozku (*Patočka et al. 2004b*).

Je to polymorfni enzym. Skládá se z několika katalytických podjednotek, z nichž každá dosahuje velikosti 70-80 kDa (*Delfino et al., 2009*).

#### ➤ Aktivní místo AChE

Aktivní centrum AChE je tvořeno, obdobně jako u ostatních serinových hydrolas, katalytickou triádou aminokyselin: serinem, glutamátém a histidinem. Tyto tři aminokyseliny jsou situovány na dně hluboké a úzké prohlubně, která proniká přibližně do poloviny enzymu. Tato prohlubeň je lemována 14 aromatickými zbytky. Díky uspořádání těchto zbytků je prohlubeň negativně nabitá, což usnadňuje přitahování pozitivně nabitého substrátu (*Delfino et al., 2009*).

Aktivní místo AChE je rozděleno na 2 části: esteratickou část, která je tvořena katalytickou triádou a anionickou část, která váže kvartérní amoniovou skupinu ACh (*Patočka et al., 2005*).

#### ➤ Mechanismus působení AChE

Principem odbourání ACh je jeho navázání na aktivní místo enzymu na základě elektrostatických interakcí: anionická část vytváří záporný náboj a přitahuje amoniovou

skupinu ACh a k esteratickému místu je poutána jeho karboxylová skupina. Výsledkem je vznik komplexu, ze kterého se nejprve odštěpuje cholin. Zůstává acetylovaný enzym, který okamžitě hydrolyzuje za vzniku kyseliny octové. Tím je struktura enzymu opět obnovena a enzym je připraven k inaktivaci další molekuly ACh (*Fokukto, 1990*).

#### ➤ Inhibitory AChE

Jedná se o látky, které blokadou AChE způsobují nahromadění ACh v organismu. Dělí se na reversibilní, pseudoireverzibilní a ireverzibilní (*Štěpánková a Komers, 2008*).

Reverzibilní inhibitory se váží se na enzym prostřednictvím nekovalentních vazeb a vytváří tak blokádu enzymu, trvající řádově minuty (*Štěpánková a Komers, 2008*). Tyto látky se označují také jako krátce působící inhibitory a nacházejí využití v medicíně, např. při léčbě glaukomu, myasthenia gravis, atoniích močového měchýře a střev, při léčbě Alzheimerovy demence (*Lincová et al., 2007*).

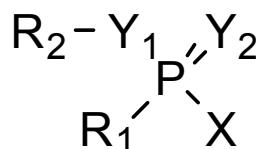
Pseudoireverzibilní neboli středně dlouze působící inhibitory vytváří s enzymem kovalentní vazbu, která je po určité době spontánně rozštěpena. Tato doba se různí podle charakteru molekuly (*Patočka et al., 2004b*). Do této skupiny látek patří karbamáty. Jedná se o estery kyseliny karbámové, používané jako insekticidy. Byly však zkoumány i jako potenciální léčiva Alzheimerovy demence, klinické uplatnění našel jen rivastigmin (*Štěpánková a Komers, 2008*).

Ireverzibilní inhibitory, nazývány též dlouze působící inhibitory, jsou po chemické stránce organofosforové sloučeniny. Navazují se pouze na esteratické místo AChE, nikoli na anionické, a toto místo fosforylují. Spontánní hydrolýza fosforylovaného enzymu nastává jen výjimečně (*Patočka et al., 2005*). Pro využití v lékařství byl testován např. účinek metrifonátu při léčbě Alzheimerovy demence. Nicméně z bezpečnostních důvodů nebylo jeho použití jako léku schváleno (*Jann et al., 2002*). Ireverzibilní inhibitory nacházejí uplatnění především v zemědělství jako insekticidy (např. parathion) a ve vojenství jako tzv. nervově paralytické látky (*Lincová et al., 2007*).

### 3.3. NERVOVĚ PARALYTICKÉ LÁTKY

Nervově paralytické látky (NPL) jsou nejvýznamnější a nejnebezpečnější skupinou bojových chemických látek (*Patočka et al., 2004a*). Bývají označovány též jako nervové jedy nebo nervové plyny. Vykazují mnohem vyšší toxicitu vůči člověku než insekticidy s podobnou chemickou strukturou.

Z chemického hlediska se jedná o organofosfáty, tedy organické estery, amidy nebo thioderiváty kyseliny fosforečné, fosfonové nebo fosfinové. Základem molekuly je atom fosforu, který vykazuje vysokou nukleofilitu a vytváří pevné vazby s kyslíkem, sírou, dusíkem a halogeny (*Delfino et al., 2009*). Jednotlivé organofosfáty se od sebe liší polohou jednotlivých skupin. Obecný vzorec organofosfátů je znázorněn na následujícím schématu:



kde Y = O (ev. S), X = F, CN, N<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SR<sub>3</sub>, S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(R<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

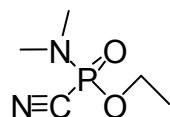
kde R<sub>3</sub> = alkyl, R<sub>1</sub> = alkyl, R<sub>2</sub> = alkyl, dialkylamoniová skupina (*Nývltová et al., 1999*).

I přes své označení nervové plyny se jedná o kapaliny. Jsou bezbarvé, bez výrazného zápachu, opticky aktivní, dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. K intoxikaci dochází vstřebáním kůží nebo inhalací (*Delfino et al., 2009*). Dělí se na dvě skupiny - G-látky a V-látky.

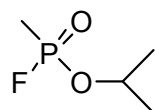
G-látky - jsou vysoce těkavé, takže k intoxikaci dochází především dýchacími cestami. Vydrží v terénu bez ztráty toxicity 12-24 hodin.

Mezi nejvýznamnější zástupce G-látek patří:

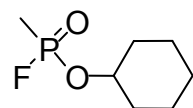
- Tabun (GA, O-ethylamidodimethylamidokyanofosfát)



- Sarin (GB, O-isopropylmethylfluorosulfonát)

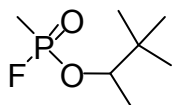


- Cyklorarin (GF, cyklohexylmethylfluorofosfonát)





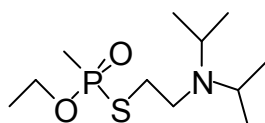
- Soman (GD, O-pinakolylmethylfluorofosfonát)



V-látky - jsou jen velmi málo těkavé, riziko inhalace je tedy minimální. K otravě dochází především vstřebáním látky kůží. V terénu vydrží týdny až měsíce.

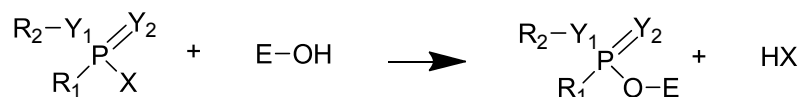
Z V-látek nachází největší uplatnění ve vojenství VX (*Patočka et al., 2004a*).

- VX (O-ethyl-S-[2-diisopropyl-aminoethyl]-methylthiofosfonát)



### 3.3.1. MECHANISMUS PŮSOBENÍ

Při navázání organofosfátu na enzym dojde k vytvoření vazby mezi kyslíkovým atomem serinu v katalytické triádě AChE (E) a atomem fosforu organofosfátu:

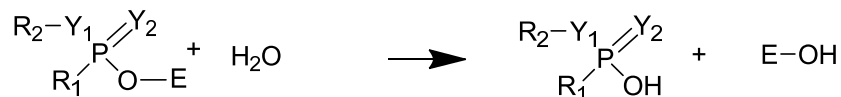


Vzniká fosforylovaný enzym, který je velmi stabilní. Tím je AChE zablokována a nemůže dále katalyzovat hydrolyzu ACh (*Patočka et al., 2005*).

Obdobným mechanismem jsou organofosfáty schopné zablokovat i BChE, ale biologický dopad není dosud plně objasněn, neboť není dostatečně známa funkce BChE. Stejně tak se organofosfáty váží i na jiné serinové hydrolasy (*Delfino et al., 2009*).

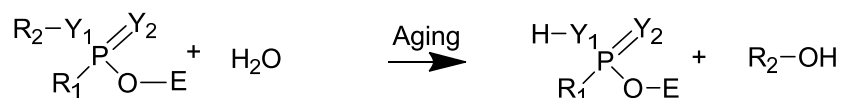
Ačkoli je vzniklý komplex enzym-organofosfát stabilní, může dojít ke dvěma jevům:

1. Vzniklý komplex spontánně hydrolyzuje, čímž dochází k obnovení aktivity AChE:



K tomuto ději dochází však jen velmi vzácně a probíhá extrémně pomalu. Nemá proto klinický význam.

2. Proces označovaný jako aging (stárnutí), při kterém dochází k dealkylaci fosforylované AChE:



Po tomto ději je enzym zcela zablokován a nelze ho již reaktivovat (*Patočka et al., 2005; Delfino et al., 2009*).

### **3.3.2. PROJEVY INTOXIKACE**

Klinické příznaky intoxikace se rozvíjí po několikaminutové latenci. Shrnují se pod pojem akutní cholinergní krize. Příznaky vyplývají z nadměrné cholinergní stimulace receptorů v periferním nervovém systému i v CNS:

- muskarinové příznaky - mióza, poruchy vidění, zvýšená sekrece slinných, potních, slzných a bronchiálních žláz, zúžení bronchů, nauzea, vomitus, křeče trávicího a močového ústrojí, zvýšená peristaltika střev, bradykardie, pokles krevního tlaku
- nikotinové příznaky - svalové záškuby a třes, křeče až paralýza kosterního svalstva, včetně dýchacího svalstva
- centrální příznaky - útlum dechového a kardiovaskulárního centra, bolest hlavy, napětí, neklid, závratě, depresivní stavy, zmatenost až bezvědomí

Úmrtí nastává za 20-30 minut. Příčinou bývá zástava dýchání s následnou zástavou srdce.

U postižených, kteří překonali akutní cholinergní krizi, se ještě po několika měsících objevují některé příznaky otravy. Především se jedná o projevy neurotoxicity (zmatenost, poruchy pozornosti, spánku, paměti, emoční labilita, depresivní stavy).

Specifickou komplikací otrav je remise otravy daná vyplavením NPL z depotních míst (týká se především somanu), nebo uvolněním NPL z vazby na bílkoviny krevní plazmy (*Patočka et al., 2004a*).

### **3.3.3. TERAPIE INTOXIKACE**

V případě zasažení organismu NPL je nutné zahájit terapii okamžitě, aby se předešlo fatálním důsledkům. V rámci technické první pomoci je nutné provést opatření, která by zabránila dalšímu pronikání jedu do organismu, tzn. opuštění zamořeného prostoru, nasazení prostředků individuální ochrany (ochranná maska, ochranný oděv) a odmoření zasažených míst (*Patočka et al., 2004a*).

Farmakologická léčba spočívá v podávání anticholinergik, reaktivátorů AChE a antikonvulziv.

#### **3.3.3.1. Anticholinergika (funkční antidota)**

Anticholinergně působící látky brání navázání ACh na cholinergní receptory. Standardně se používá atropin. Působí jako kompetitivní antagonist na muskarinových

receptorech, zmírňuje tedy pouze muskarinové příznaky. Na nikotinové příznaky vliv nemá a vzhledem k tomu, že obtížně prochází přes hematoencefalickou bariéru, výrazně nepotlačuje ani centrální příznaky (*Delfino et al., 2009*).

Podává se i.m. nebo i.v. v dávce 2-4 mg opakovaně v 10-30 minutových intervalech. Podávání atropinu pokračuje do prvních příznaků atropinizace. Celková dávka může dosáhnout až 100 mg za 24 hodin.

V případě potřeby lze atropin kombinovat s anticholinergiky s převahou centrálního účinku (např. banactyzin, biperiden, skopolamin) (*Patočka et al., 2004a*).

### **3.3.3.2.      Reaktivátory AChE (kauzální antidota)**

Reaktivátory mají schopnost rozštěpit vazbu enzym-organofosfát a tím obnovit funkci inhibované AChE. Zmírňují především nikotinové příznaky (*Delfino et al., 2009*).

#### ➤ Chemická struktura a vlastnosti

Společnými prvky chemické struktury je jeden nebo dva pyridiniové kruhy a jedna nebo dvě oximové skupiny. Oximová skupina je vysoce nukleofilní a napadá atom fosforu v komplexu enzym-organofosfát. Vzniká přechodný útvar, ze kterého je následně uvolněn enzym, který je opět plně funkční (*Patočka et al., 2004b; Delfino et al., 2009*). Zbýlý komplex oxim-organofosfát je nestabilní a je organismem rychle odbouráván (řádově v minutách až hodinách) (*Patočka et al., 2004a*).

Oximy jsou však schopné reaktivovat pouze „nezestárlý“ enzym, proto je nutné jejich včasné podání.

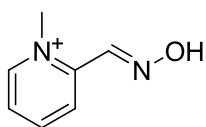
Díky amoniové skupině jsou tyto látky dosti hydrofilní. Špatně se tedy vstřebávají po p.o. podání, mají krátký biologický poločas (1-2 hodiny) a těžce pronikají hematoencefalickou bariérou (*Voicu et al., 2010*). Kromě schopnosti reaktivovat inhibovanou AChE vykazují i vlastní toxické účinky (*Stojilkovica a Jokanovic, 2006*).

I přes společné rysy se jednotlivé oximy navzájem liší v účinnosti vůči různým organofosfátům. Dosud nebyl vyvinut takový reaktivátor, který by efektivně působil proti všem známým nervovým jedům

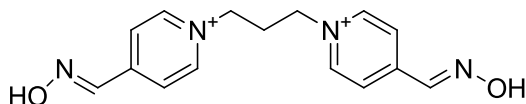
Všechny výše uvedené skutečnosti jsou důvodem stále probíhajícího výzkumu, který přináší řadu nových sloučenin.

Některé z klasických oximů i novějších jsou uvedeny níže (*Delfino et al., 2009*):

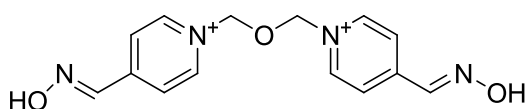
- *Pralidoxim (2-PAM, 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium)*



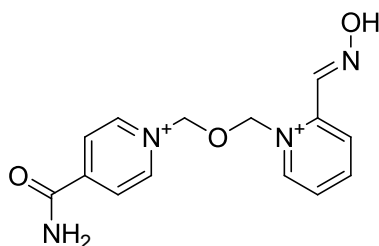
- *Trimedoxim (TMB-4, 1,3-bis(4-hydroxyiminopyridinium)propan)*



- *Obidoxim (Toxogonin<sup>®</sup>, 1,3-bis(4-hydroxyiminopyridinium)-2-oxapropan)*

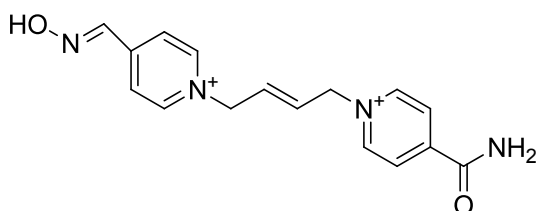


- *HI-6 (asoxim, 1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxa-propan*



- *K203 ((E)-1-(4-karbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)*

Tento oxim je jeden z řady reaktivátorů syntetizovaných na Katedře toxikologie, FVZ UO. Jeví se jako jeden z nejperspektivnějších při léčbě intoxikace tabunem (Karasová *et al.*, 2010). Ovšem na rozdíl od výše jmenovaných není komerčně dostupný.



### 3.3.3.3. Antikonvulziva

Antikonvulziva tlumí CNS a tím zmírňují křečové stavy. Nejčastěji se používá diazepam (Patočka *et al.*, 2004a).

V současné době se výzkum zaměřuje i na možnosti premedikace v případě očekávané expozice NPL

K tomuto účelu se ukazuje jako výhodné využití karbamátů, které vazbou na molekulu AChE brání navázání organofosfátů. Avšak na rozdíl od organofosfátů komplex enzym-karbamát po určité době spontánně hydrolyzuje. Další možností je využití látek, které zachytí NPL v organismu ještě před jejím působením (např. BChE) (*Delfino et al., 2009*).

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Oximové reaktivátory - byly připraveny na Katedře toxikologie, FVZ UO v Hradci Králové a jejich čistota byla ověřena TLC analýzou.

Soman - byl získán z Vojenského technického ústavu v Brně a bylo s ním manipulováno v prostorách Katedry toxikologie, FVZ UO v Hradci Králové na základě povolení SÚJB pouze proškoleným personálem v zaměstnaneckém poměru FVZ UO.

Destilovaná voda - byla připravena na Katedře toxikologie, FVZ UO v Hradci Králové reverzní osmózou millipore.

Všechny ostatní použité chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich:

Acetylthiocholin chlorid (ATChCl,  $\geq 99\%$  (w/w))

Atropin ( $\geq 99,0\%$  (w/w))

Dimethylsulfoxid (DMSO,  $\geq 99,9\%$  (w/w))

5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina (DTNB,  $\geq 98\%$  (w/w))

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA,  $\geq 99,0\%$  (w/w))

Fyziologický roztok

Chlorid železitý ( $\text{FeCl}_3$ ,  $97\%$  (w/w))

Chlorovodíková kyselina (HCl,  $36,5 - 38,0\%$  (w/w))

Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH,  $\geq 95,0\%$ , (w/w))

Oxidovaný glutathion (GSSG,  $\geq 98\%$  (w/w))

Thiobarbiturová kyselina (TBA,  $\geq 98,0\%$  (w/w))

Total Protein Kit:

Barvivo - Brilliant Blue G

Proteinový standard - lidský sérový albumin  $0,3\text{ mg/ml}$

Trichloroctová kyselina (TCA,  $\geq 99,0\%$  (w/w))

2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazin (TPTZ,  $\geq 98\%$  (w/w))

## 4.2. POMŮCKY A PŘÍSTROJE

Byl použit následující spotřební materiál: mikrozkuřavky (Eppendorf), kyvety, kádinky, špičky na pipety.

Laboratorní pomůcky: automatické pipety.

Laboratorní přístroje: analytické váhy (CPA225D, Sartorius, Německo), centrifuga (Universal 320/R, Schoeller, Německo), ultrazvuk (Ema, Elmasonic, Německo), blokový termostat (MBT 250, Kleinfeld Labortechnik, Německo), spektrofotometr (Helios Zeta, Thermo Scientific, USA), homogenizátor s nerezovým nožem (Ultra-Turrax T 10 basic, IKA, Německo).

## 4.3. LABORATORNÍ ZVÍŘATA

K experimentům bylo využito celkem 48 samců potkanů kmene Wistar (Anlab, Praha) o váze 180-200 g. Potkani byli udržováni v klimatizované místnosti při teplotě  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , vlhkosti  $50 \pm 10\%$  a se světlem od 7. do 19. hodiny. Byli krmeni standardní stravou a vodou *ad libitum*. Experimenty proběhly pod dohledem Etické komise Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové. Veškerá manipulace se zvířaty byla prováděna pracovníkem s platnou akreditací pro tuto činnost.

## 4.4. EXPERIMENT *IN VIVO*

Potkani byli rozděleni do osmi skupin po šesti zvířatech. Zvířatům v 1. skupině byl aplikován pouze atropin, ve 2. skupině soman a po 1 minutě atropin. Zvířatům ve skupinách 3-7 byl podán nejprve atropin a po 1 minutě soman a jednotlivé sledované oximy (HI-6, trimedoxim a K203), případně jejich kombinace (HI-6 + trimedoxim, HI-6 + K203). 8. skupina je skupina kontrolní - zvířatům byl podán pouze fyziologický roztok. Všechny látky byly potkanům aplikovány intramuskulárně, atropin ve všech skupinách v dávce 23 mg/kg, soman v množství odpovídajícím  $1 \times \text{LD}_{50}$ , oximy v celkové dávce 60  $\mu\text{mol/kg}$ . Pro lepší orientaci je průběh experimentu rozepsán v následujícím přehledu:

1. skupina: atropin (23 mg/kg) i.m.
2. skupina: soman (1 x LD<sub>50</sub>) i.m. - po 1 min atropin (23 mg/kg) i.m.
3. skupina: soman (1 x LD<sub>50</sub>) i.m. - po 1 min atropin (23 mg/kg) i.m. a HI-6 (60 μmol/kg) i.m.
4. skupina: soman (1 x LD<sub>50</sub>) i.m. - po 1 min atropin (23 mg/kg) i.m. a trimedoxim i.m. (60 μmol/kg) i.m.
5. skupina: soman (1 x LD<sub>50</sub>) i.m. - po 1 min atropin (23 mg/kg) i.m. a K203 i.m. (60 μmol/kg)
6. skupina: soman (1 x LD<sub>50</sub>) i.m. - po 1 min atropin (23 mg/kg) i.m., HI-6 (30 μmol/kg) i.m. a trimedoxim (30 μmol/kg) i.m.
7. skupina: soman (1 x LD<sub>50</sub>) i.m. - po 1 min atropin (23 mg/kg) i.m., HI-6 (30 μmol/kg) a K203 i.m. (30 μmol/kg)
8. skupina: kontrolní skupina - aplikován pouze fyziologický roztok i.m.

30 minut po expozici somanem byla zvířata usmrcena dekapitací s využitím anestézie CO<sub>2</sub>. Následně jim byla odebrána krev a játra. Krev byla heparinizována a rozdělena centrifugací (3000 ot./min, 15 min, 15°C) na 2 části - plazmu a erytrocyty. Všechny odebrané biologické materiály byly před měřením uchovávány zmrazené při -80°C.

#### **4.4.1. ÚPRAVA BIOLOGICKÝCH VZORKŮ**

##### **Příprava hemolyzátu**

Vzorky erytrocytů byly zředěné destilovanou vodou v poměru 1:4 a následně odstředěné (3000 ot./min, 5 min, 20°C). Další práce probíhala se supernatantem, který byl použit k okamžitému měření nebo uchováván při -80°C pro pozdější měření.

##### **Homogenizace jater**

Ze vzorku jater byla odebrána část o hmotnosti přibližně 100 mg a přidán 1 ml destilované vody. Homogenizace byla prováděna v mikrozkuhavce pomocí homogenizátoru po dobu pěti minut. Vzniklá suspenze byla použita k okamžitému měření nebo uchovávána při -80°C pro pozdější měření.



## 4.5. POUŽITÉ METODY

### 4.5.1. THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES (TBARS)

#### Příprava roztoků

Blank: 200  $\mu$ l fyziologického roztoku + 400  $\mu$ l TCA

TBA: 0,067 g TBA bylo rozpuštěno v 1 ml DMSO a doplněno vodou do 10 ml

TCA: 10% roztok ve vodě (w/v)

#### Pracovní postup

Do mikrozkušavky bylo pipetováno 200  $\mu$ l vzorku a 400  $\mu$ l TCA. Precipitát byl ponechán inkubovat 15 minut v ledu a následně oddělen centrifugací (3000 ot./min, 15 min, 4°C). K 400  $\mu$ l odebraného supernatantu bylo přidáno 400  $\mu$ l TBA a tato směs byla zahřívána na vodní lázni 10 minut. Po zchlazení na laboratorní teplotu bylo provedeno spektrofotometrické měření při vlnové délce 532 nm proti blanku.

### 4.5.2. STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHIONREDUKTASY

#### Příprava roztoků

EDTA: 10mM roztok ve vodě

GSSG: 10mM roztok ve vodě

NADPH: 1mM roztok ve vodě

PBS: 0,1M fosfátový pufr s 0,15 M NaCl pH 7,4

#### Pracovní postup

Kyveta byla naplněna 100  $\mu$ l roztoku GSSG a 100  $\mu$ l roztoku NADPH. Směs byla zředěna 650  $\mu$ l PBS. Dále bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku EDTA. Reakce byla započata přidáním 50  $\mu$ l vzorku. Asorbance byla měřena při 340 nm v čase nula a po 120 vteřinách.

### 4.5.3. FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP)

#### Příprava roztoků

Acetátový pufr: 0,1M pH 3,6

Blank: 200  $\mu$ l FRAP reagens + 800  $\mu$ l destilované vody

FeCl<sub>3</sub>: 20mM roztok ve vodě

FRAP reagens: 2,5 ml TPTZ + 2,5 ml FeCl<sub>3</sub> + 25 ml acetátového pufru

TPTZ: 10mM roztok v 40mM HCl

### **Pracovní postup**

Čerstvě připravený roztok FRAP reagens byl zahříván při teplotě 37°C po dobu 10 minut. 200 µl této směsi bylo pipetováno do mikrozkušavky a přidáno 30 µl vzorku a 770 µl vody. Po desetiminutové inkubaci při pokojové teplotě byly mikrozkušavky vloženy do centrifugy (10000 ot./min, 10 min, 21°C). Měření proběhlo se supernatantem při vlnové délce 593 nm proti blanku.

#### **4.5.4. TOTAL PROTEIN**

### **Příprava roztoků**

Blank: 50 µl fyziologického roztoku + 2,5 ml roztoku brilantové modři

Roztok brilantové modři: Brilliant Blue G zředěna čtyřikrát ve fyziologickém roztoku

Standard: 50 µl proteinového standardu + 2,5 ml roztoku brilantové modři

### **Pracovní postup**

Ke stanovení celkového množství proteinů v plazmě byl použit Total Protein Kit. 50 µl vzorku bylo dvacetkrát zředěno fyziologickým roztokem a přidáno 2,5 ml roztoku brilantové modři. Po dvou minutách inkubace proběhlo měření absorbance při 595 nm. Koncentrace proteinů byla vypočítána dle uvedeného vzorce:

$$c = A_{(\text{test})} \cdot c_{(\text{standard})} / A_{(\text{standard})}$$

c .... koncentrace proteinů ve vzorku [mg/ml]

A<sub>(test)</sub> .... absorbance testovaného vzorku

c<sub>(standard)</sub> .... koncentrace standardu (0,3 mg/ml)

A<sub>(standard)</sub> .... absorbance proteinového standardu

#### **4.5.5. STANOVENÍ AKTIVITY ACETYLCHOLINESTERASY**

##### **Příprava roztoků**

Blank: 200  $\mu$ l fyziologického roztoku + 800  $\mu$ l směsi roztoku DTNB a roztoku ATChCl (1:1)

PBS: 0,1M fosfátový pufr s 0,15 M NaCl pH 7,4

Roztok DTNB: 8 mg DTNB v 10 ml PBS

Roztok ATChCl: 1mM roztok v PBS

Tris pufr: 0,02M pH 7,6

##### **Pracovní postup**

Vzorky erytrocytů byly zředěny v poměru 1:20 pomocí Tris pufru. K takto připravenému hemolyzátu bylo přidáno 800  $\mu$ l směsi obsahující 400  $\mu$ l roztoku DTNB a 400  $\mu$ l roztoku ATChCl. Směs byla promíchána a ponechána inkubovat 30 vteřin. Byl měřen pětiminutový rozdíl absorbance při 412 nm.

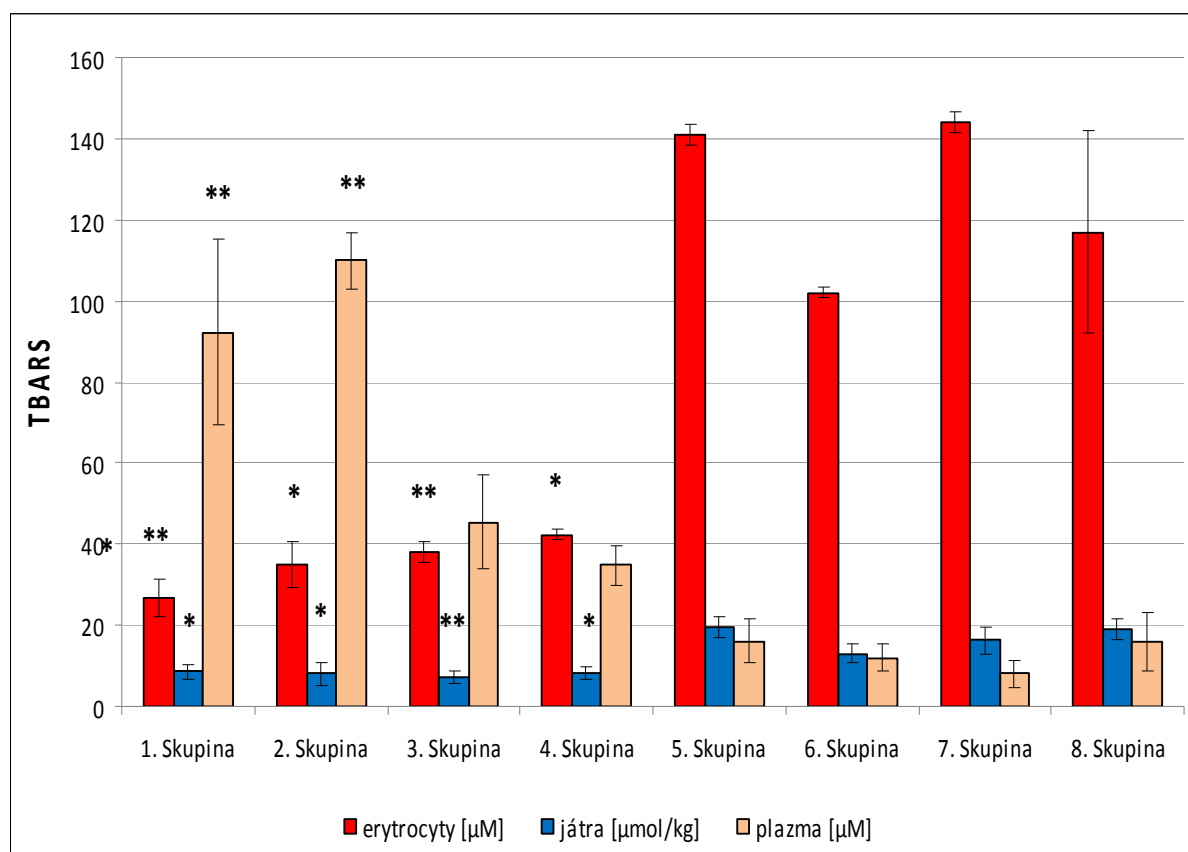
#### **4.6. STATISTICKÁ ANALÝZA**

Všechna experimentálně získaná data byla analyzována technikou ANOVA s Tukey testem oproti kontrole za použití statistického software Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES (TBARS)

Koncentrace MDA jako konečného produktu lipidové peroxidace byla stanovována metodou TBARS. Výsledky měření v erythrocytech, játrech a plazmě jsou uvedeny na obrázku č. 1.



**Obr. č. 1: Hodnoty TBARS v erythrocytech, játrech a plazmě.** Data byla statisticky zpracována technikou ANOVA s Tukey testem oproti kontrole. Výsledky jsou znázorněny jako průměrné hodnoty, chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku ( $n=6$ ). Symbol \* označuje signifikanci na hladině významnosti 0,05 a \*\* signifikanci na hladině významnosti 0,01.

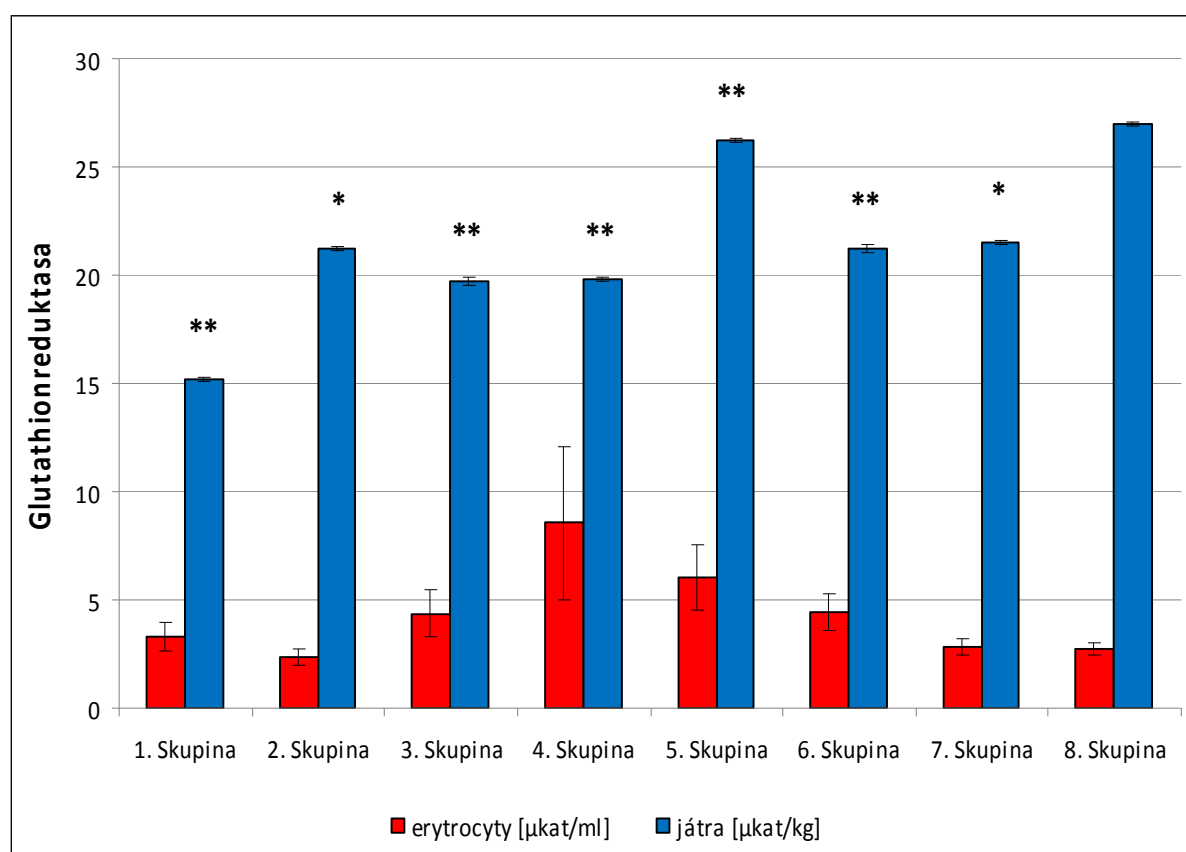
V plazmě je patrný signifikantní nárůst koncentrace MDA ve skupině č. 1 intoxikované pouze atropinem. Další navýšení je patrné po intoxikaci somanem (skupina č. 2). Ve skupinách léčených oximy koncentrace MDA klesá, byť tyto hodnoty nejsou statisticky signifikantní. Nižší hladina MDA než v kontrolní skupině byla zaznamenána ve skupinách č. 6 a 7.

Statisticky signifikantní data ve vzorcích erytrocytů a jater byla získána jen u prvních čtyřech skupin. Hodnoty v erytrocytech byly v těchto čtyřech skupinách výrazně nižší ve srovnání s kontrolou. Nárůst koncentrace MDA byl zaznamenán pouze u skupin č. 5 a 7.

V játrech byly naměřeny vyšší hodnoty ve srovnání s kontrolní skupinou jen u skupiny č. 5. V ostatních skupinách je patrný pokles hladiny MDA bez výraznějších rozdílů v rámci jednotlivých skupin.

## 5.2. STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHIONREDUKTASY

Výsledky měření aktivity glutathionreduktasy v erytrocytech a játrech znázorňuje obrázek č. 2.



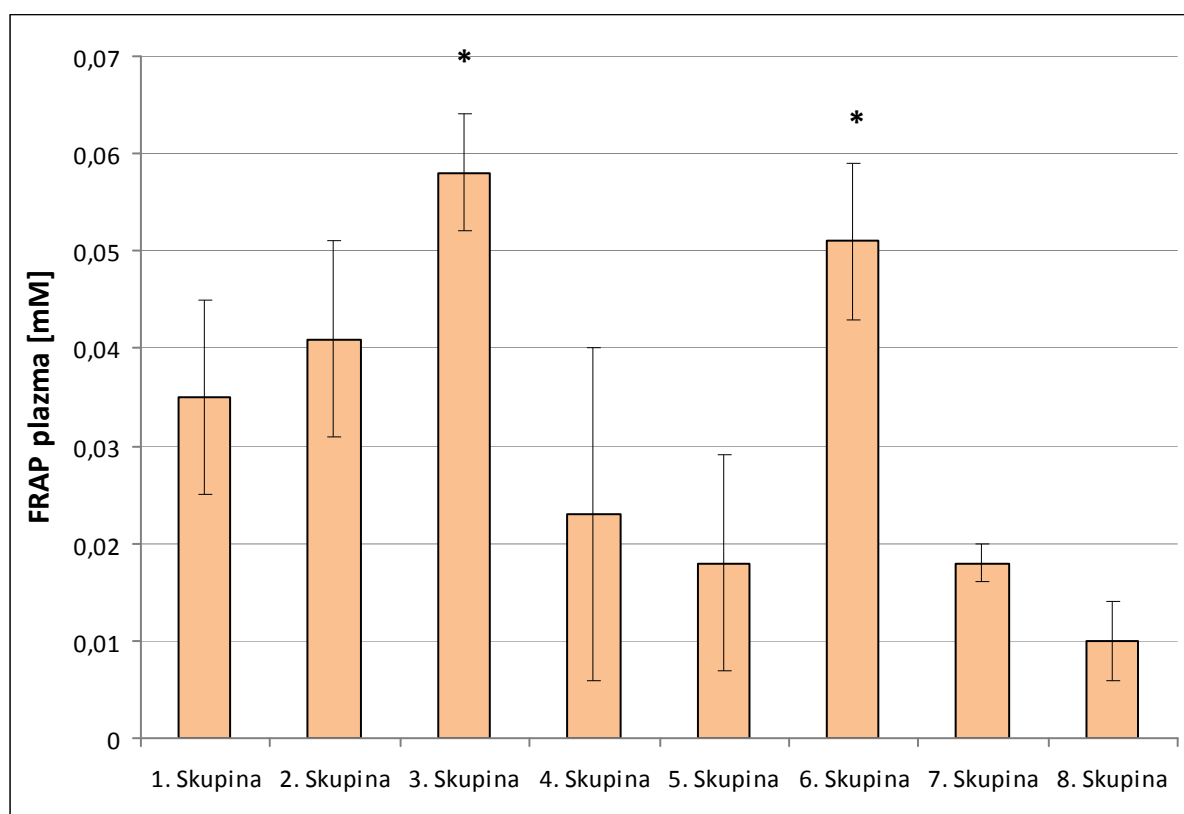
**Obr. č. 2: Aktivita glutathionreduktasy v erytrocytech a játrech.** Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka ( $n=6$ ), která je v grafu znázorněna chybovými úsečkami. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl od kontrolní skupiny (ANOVA s Tukey testem; \* = 0,05, \*\* = 0,01).

V játrech bylo zaznamenáno statisticky významné snížení aktivity glutathionreduktasy u všech skupin ve srovnání s kontrolou. Naopak zvýšení aktivity glutathionreduktasy vykazují

s výjimkou 2. skupiny (atropin + soman) vzorky erytrocytů. Nejvýraznější je nárůst tohoto parametru u 4. a 5. skupiny. Data získaná měřením aktivity glutathionreduktasy v erytrocytech však nejsou podložena statistickou významností

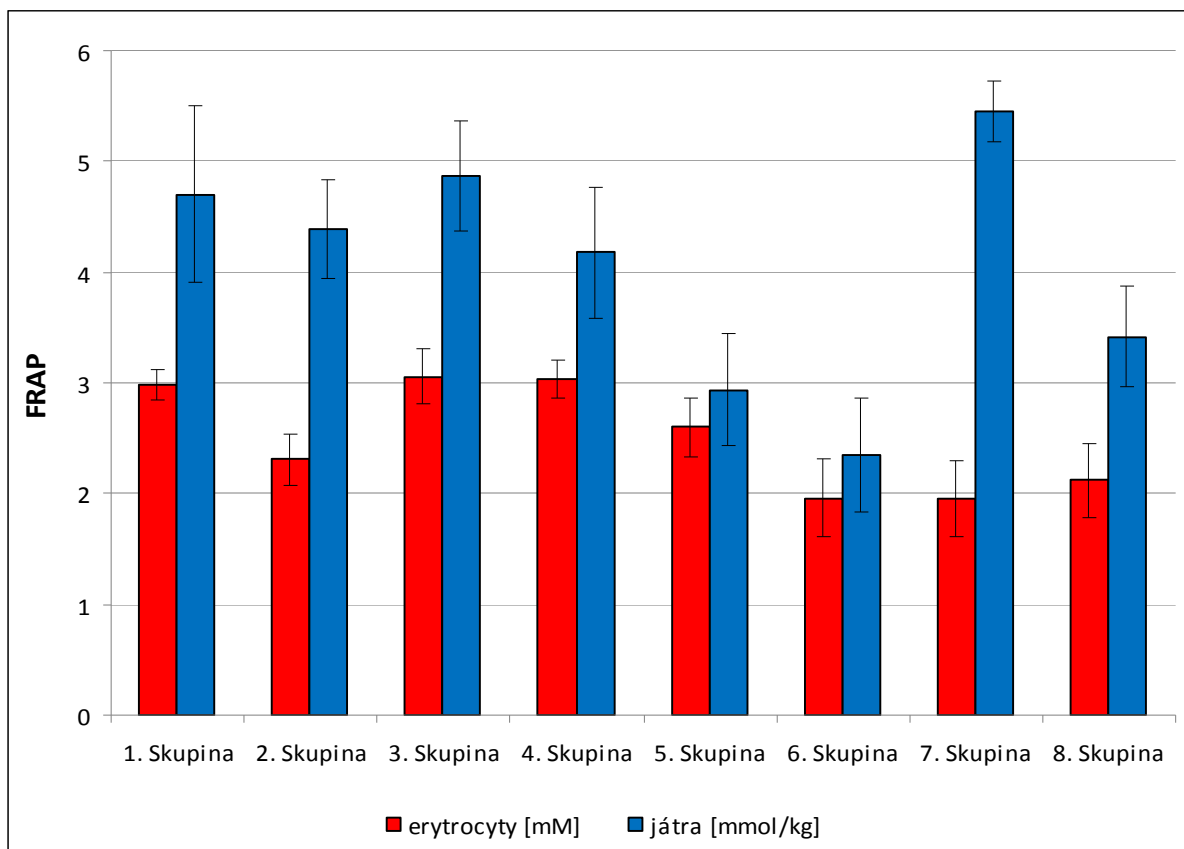
### 5.3. FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP)

Plazmatické hladiny nízkomolekulárních antioxidantů vyjádřené hodnotou FRAP jsou v našem experimentu u všech skupin vyšší ve srovnání s kontrolou (viz Obr. č. 3). Statisticky významné je však toto navýšení pouze u skupiny č. 3 (HI-6) a č. 6 (HI-6 + trimedoxim). U ostatních skupin není toto zvýšení tak výrazné a není statisticky signifikantní.



**Obr. č. 3: Hladiny antioxidantů v plazmě měřené metodou FRAP.** V grafu jsou zaznamenány průměrné hodnoty, chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku (n=6). Všechna data byla analyzována užitím systému ANOVA s Tukey testem. Statistická významnost je 0,05 (\*) oproti kontrole.

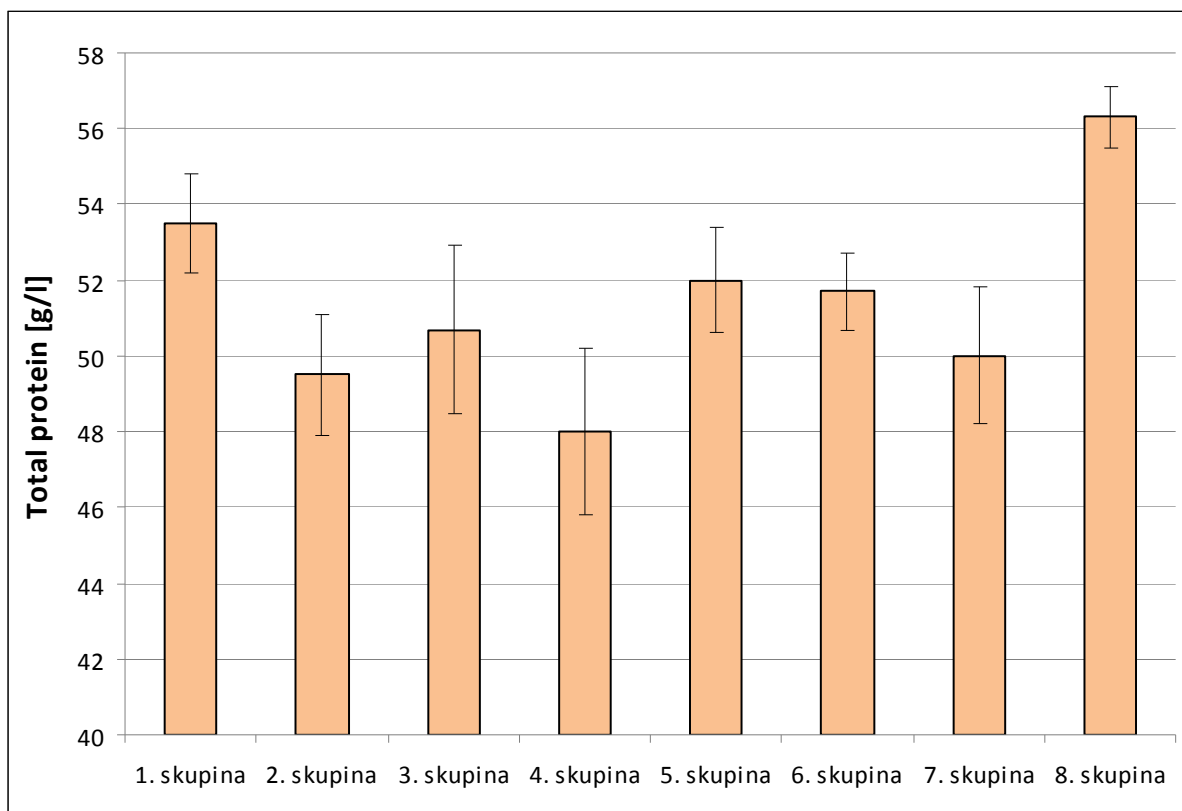
V erytrocytech bylo zaznamenáno snížení hladiny antioxidantů u skupin č. 6 a 7, v játrech u skupin č. 5 a 6 (viz Obr. č. 4). Nejvýraznější nárůst jaterních antioxidantů je patrný u skupiny č. 7 (HI-6 + K203). Data z jater a erytrocytů však nejsou signifikantní.



**Obr. č. 4: Hladiny antioxidantů v erythrocytech a játrech měřené metodou FRAP.** V grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty, směrodatné odchylky (n=6) jsou znázorněny jako chybové úsečky. Statisticky významné rozdíly nebyly zaznamenány (ANOVA, Tukey test).

#### 5.4. KONCENTRACE PROTEINŮ V PLAZMĚ

Na obrázku č. 5 jsou uvedeny hladiny plazmatických proteinů naměřené v našem experimentu. Je patrné, že u všech skupin bylo zaznamenáno mírné snížení oproti kontrolní skupině, nejvýrazněji ve skupině č. 4 (léčba trimesoximem).

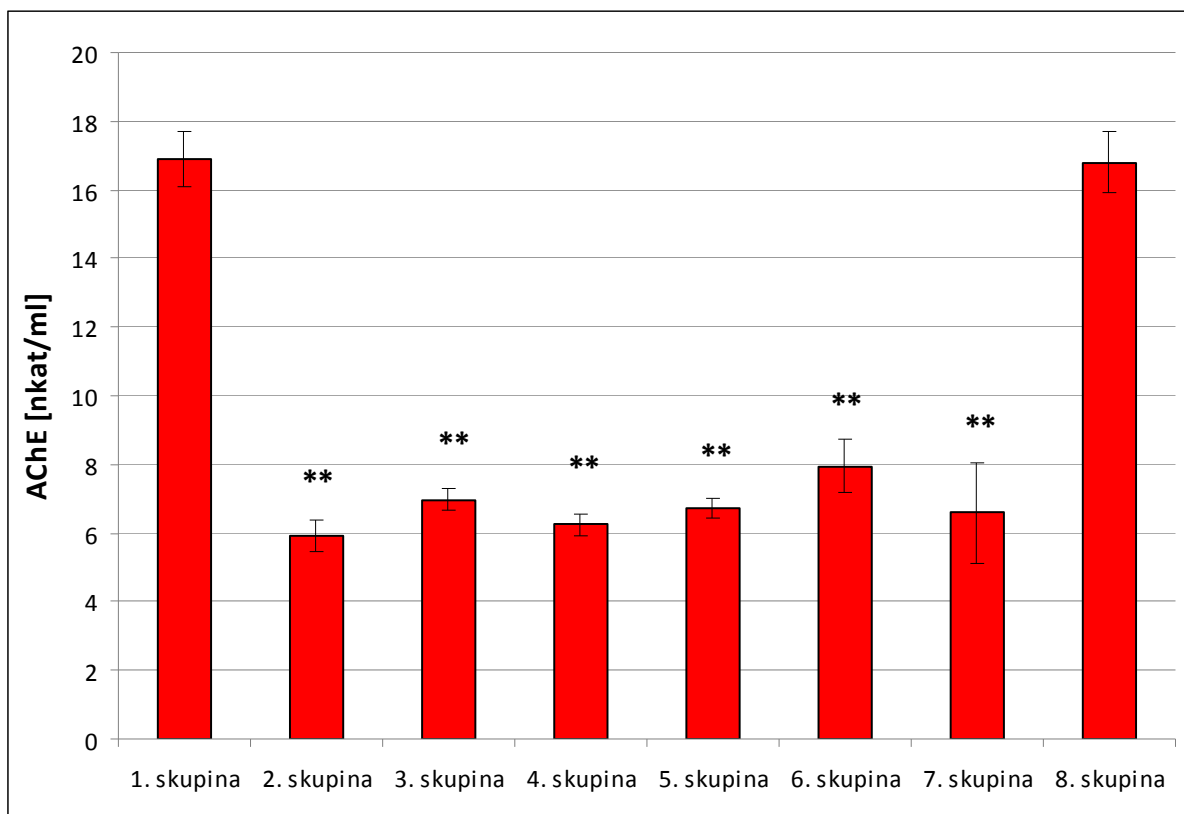


**Obr. č. 5: Koncentrace proteinů v plazmě.** Graf představuje průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky ( $n=6$ ), které jsou zakresleny jako chybové úsečky. Statisticky významné rozdíly nebyly zaznamenány (ANOVA, Tukey test).

### 5.5. STANOVENÍ AKTIVITY ACETYLCHOLINESTERASY

Experimentálně získaná data z měření aktivity AChE Ellmannovou metodou v erytrocytech jsou uvedena na obrázku č. 6. Dle předpokladu je aktivita AChE u první skupiny intoxikované pouze atropinem srovnatelná s kontrolní skupinou, i když tento údaj není statisticky signifikantní. Naopak zbylá data byla signifikantní na hladině významnosti 0,01. Nejnižší aktivita byla zjištěna po podání somanu, jehož toxické účinky spočívají v inhibici AChE. Nejvyšší účinnost reaktivací terapie byla zaznamenána u skupiny č. 6, tedy kombinací léčby HI-6 a trimedoxim. Ze samostatných použitých oximů nejlépe reaktivuje AChE HI-6 (skupina č. 3).





**Obr. č. 6: Aktivita AChE v erytrocytech.** V grafu jsou zaznamenány naměřené hodnoty jako průměr, směrodatné odchytky (n=6) jsou znázorněny jako chybové úsečky. Data byla analyzována technikou ANOVA s Tukey testem. Statisticky zaznamenané rozdíly oproti kontrolní skupině se pohybují na hladině významnosti 0,01 a jsou v grafu označeny hvězdičkami (\*\*).

## 6. DISKUSE

Organofosforové sloučeniny patří mezi stále intenzivně zkoumané látky. Důvodem je nejen jejich hrozící zneužití jako vojenských chemických látek například při teroristických útocích, ale i časté otravy objevující se v souvislosti s používáním organofosforových insekticidů. V rámci sledování jejich chronické, subchronické i akutní toxicity byly pozorovány v organismu změny charakteristické pro oxidační stres. I když význam tohoto jevu není dosud objasněn (*Vidyasagar et al., 2004*), je studium volných radikálů a jejich účinků na intoxikovaný organismus jedním ze směrů, kterým se ubírá výzkum v této oblasti. Ukazuje se rovněž, že intoxikace je provázena změnou v hladinách nízkomolekulárních antioxidantů a poměrem dostupných antioxidantů a různých forem reaktivního kyslíku (*Pohanka et al., 2009*). Tato práce se zabývala sledováním parametrů oxidačního stresu v případě akutní otravy somanem a léčbě atropinem a oximovými reaktivátory. Podařilo se zde prokázat význam léčby intoxikace organofosforovými sloučeninami pomocí oximových reaktivátorů.

K hodnocení míry lipoperoxidace byla použita metoda TBARS. I když je tato metoda považována za málo citlivou (*Karatas et al., 2002; Tug et al., 2005*), je její použití stále obecně nejrozšířenější. Výhodou je pak dlouhodobá perzistence sledovaného markeru, MDA, v biologických vzorcích. Principem je reakce MDA jako konečného produktu oxidačního poškození biomembrán s thiobarbiturovou kyselinou za vzniku barevného produktu, který je možné kvantifikovat spektrofotometricky (*Štípek et al., 2000*). Výrazný nárůst koncentrace MDA v plazmě byl zjištěn po podání atropinu samotného, i po následné intoxikaci somanem. Naopak snížení hladin tohoto parametru bylo zaznamenáno po léčbě oximovými reaktivátory téměř u všech skupin ve srovnání s kontrolní skupinou. Z uvedeného lze usuzovat, že systém antioxidantní ochrany byl aktivován v dostatečné míře, aby bylo zabráněno nežádoucí lipoperoxidaci. Data tedy ukazují na pozitivní vliv léčby na redoxní rovnováhu organismu. K podobným závěrům došel například *Pohanka et al., 2009*.

Experimentální hodnoty TBARS korelují s hodnotami aktivit glutathionreduktasy. Glutathionreduktasa katalyzuje přeměnu oxidovaného glutathionu (GSSG) zpět na jeho redukovanou formu (GSH), za současné oxidace NADPH na  $\text{NADP}^+$ . Námi použitá metoda, upravená dle postupu popsáním Carlbergem a Mannervikem, 1975, detekuje změny absorbance spojené s touto oxidační reakcí. GSH je intracelulární antioxidant, jeden z nejdůležitějších v obraně organismu vůči oxidačnímu stresu. Nárůst hodnot

glutathionreduktasy je tedy obranný mechanismus, kterým je zajištěna dostupnost GSH (Łukaszewicz-Hussain a Moniuszko-Jakoniuk, 2004). Zaznamenané zvýšení aktivity tohoto enzymu v erytrocytech může být považováno za doklad zvýšené pohotovosti organismu vůči oxidační zátěži. Srovnáním s hodnotami TBARS lze usuzovat, že obrana proběhla úspěšně. V jaterních vzorcích se však aktivita snížila. Systém antioxidační ochrany tvoří vysoce propracovaný a navzájem propojený celek a je zřejmé, že léčba do něho prokazatelně zasahuje. Nicméně molekulární mechanismus, který by vysvětloval chování glutathionreduktasy při oxidační zátěži, není ještě zcela pochopen.

Zatímco aktivita glutathionreduktasy poukazuje na ochranu organismu před oxidačním stresem, hladina nízkomolekulárních antioxidantů reprezentovaná hodnotou FRAP vypovídá o tom, zda byl oxidační stres organismem zvládnut. Úkolem jednotlivých antioxidantů jako obranného mechanismu je ničit potenciální oxidanty, předcházet vzniku a vychytávat volné radikály a tím minimalizovat jejich poškozující vliv na biomolekuly. Změna hladiny antioxidantů vyvolá změnu v redoxním potenciálu. Tyto změny se dají vizualizovat přidáním komplexu  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -tripyridyltriazin, který v kyselém prostředí redukcí přechází na modrý komplex. Intenzita zbarvení je přímo úměrná hladině nízkomolekulárních antioxidantů a je detekována spektrofotometricky (Benzie a Strain, 1996). Ranjbar et al., 2002 zjistil, že jím zaznamenaná zvýšená lipoperoxidace odpovídá snížení hladin nízkomolekulárních antioxidantů. V námi naměřených výsledcích je patrná korelace mezi nárůstem hodnot FRAP a poklesem hodnot TBARS oproti kontrolní skupině. Lze tedy dedukovat, že snížení lipoperoxidace je důsledkem zvýšení hladin nízkomolekulárních antioxidantů.

Plazmatické proteiny byly stanovovány pomocí barviva brilantové modři metodou popsanou M. Bradfordovou, 1976. Brilantová modř mění vazbou na proteiny barvu z červené na modrou. Změna barvy je lineárně závislá na množství proteinu přítomném ve vzorku a je stanovována pomocí spektrofotometru. Proteiny krevní plazmy zastávají významnou roli v řadě tělesných funkcí (udržení onkotického tlaku, transport látek, hemokoagulace a fibrinolýza, enzymatické funkce, ochrana před volnými radikály). Většina z nich je syntetizována v játrech. Námi zaznamenaný mírný pokles oproti kontrolní skupině může být dokladem jaterního poškození v důsledku otravy.

Za hlavní mechanismus toxicity organofosfátů je považována inhibice AChE. Stanovení aktivity tohoto enzymu je tedy důležitým parametrem nejen pro diagnostiku, ale i zhodnocení účinnosti reaktivační terapie (Karasová et al., 2010). Ke stanovení aktivity AChE v tomto experimentu byla vybrána běžně používaná Ellmanova metoda. Jako substrát pro AChE využívá thiolový analog acetylcholinu acetylthiocholin. Jeho hydrolyzou vzniká

thiocholin, který reaguje s 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou) kyselinou (DTNB, tzv. Ellmanovo činidlo) za vzniku 5-merkaptu-2-nitrobenzoového aniontu. Žluté zbarvení tohoto aniontu umožňuje spektrofotometrickou detekci (Karasová et al., 2010).

Data získaná měřením aktivity AChE jsou v souladu s dalšími studii. Za současnosti nejúčinnější oxim v léčbě intoxikace somanem je považován HI-6. Nově syntetizovaný oxim K203 vykazuje srovnatelnou aktivitu s trimedoximem i HI-6 (Kassa et al., 2010). Kombinační léčba není výrazně efektivnější než léčba samotnými oximy (Kassa et al., 2009).

Souvislost mezi aktivitou AChE a oxidační zátěží nebyla v tomto experimentu zjištěna. V některých pracích týkajících se sledování toxicity organofosforových insekticidů byla mezi těmito dvěma jevy pozorována korelace (Ranjbar et al., 2002, Akhgari et al., 2003). Nicméně zvýšení aktivity AChE po léčbě oximovými reaktivátory se změnami v parametrech oxidačního stresu nekorresponduje (Pohanka et al., 2009, Vidyasagar et al., 2004).

Oximy byly objeveny jako potenciální antidota při otravách organofosfáty již v polovině minulého století. I přes intenzivně probíhající výzkum a stovky nově nasyntetizovaných molekul se v klinické praxi uplatňují jen pralidoxim, obidoxim, trimedoxim a HI-6 (Reiner et al., 2007). Trimedoxim je z výše uvedených oximových reaktivátorů nejtoxičtější. Naopak HI-6 je považován za nejméně toxický oximový reaktivátor (Stojilkovic a Jokanovic, 2006). V tomto experimentu bylo však podání HI-6 ať již samotného nebo v kombinaci spojeno se signifikantním vzestupem hladiny antioxidantů, což dokumentují plazmatické FRAP hodnoty. HI-6 tedy zatížil organismus vyšším oxidačním stresem ve srovnání s ostatními oximy. K obdobnému závěru došel i Pohanka et al., 2009.

Léčba oximovými reaktivátory není ideální. Hlavními problémy jsou nedostatečná účinnost oximů a jejich toxicita (Peter et al., 2008). Tyto nevýhody současné standardní terapie stimulují k hledání alternativní léčby. Jedním z nových přístupů je využití antioxidantů jako adjuvantních prostředků (Balali-Mood et al., 2006). Ideálním řešením by byla léčba oximem, který je schopný nejen reaktivovat AChE, ale i vychytávat volné radikály (Puntel et al., 2008).

Názory na antioxidační vlastnosti současně známých a používaných oximů jsou nejednoznačné. Kolečkář et al., 2007 testovali antioxidační aktivitu vybraných oximových reaktivátorů i atropinu screeningovým testem. V jejich studii nevykazoval ani jeden z nich schopnost pohlcovat volné radikály. Vidyasagar et al., 2004 nepozoroval *in vivo* změny oxidačních parametrů po léčbě pralidoximem a atropinem. V některých dalších experimentech

bylo zjištěno zvýšení oxidační zátěže po podání některých reaktivátorů (*Pokanka et al., 2009*).

V tomto experimentu se podařilo prokázat, že intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteras i následná léčba jsou provázeny výraznou změnou v redoxních vlastnostech. Tyto jevy je však třeba do budoucna blíže prozkoumat. Pozornost by měla být věnována například analýze vztahů mezi různými NPL i jednotlivými oximy a generací oxidačního stresu. Objasnění těchto vztahů by přispělo k lepšímu pochopení dějů probíhajících v organismu po intoxikaci i léčbě a určení jejich významu.

## 7. ZÁVĚR

V práci byly sledovány parametry oxidačního stresu v biologických vzorcích potkanů, kterým byl aplikován soman, atropin a vybrané oximové reaktivátory cholinesteras. K tomuto účelu bylo využito několik metodik vypovídajících o míře poškození lipidů v důsledku oxidační zátěže (TBARS) a o úrovni enzymatické (aktivita glutathionreduktasy) i neenzymatické (FRAP) antioxidační ochrany. Tato měření byla doplněna o stanovení celkové hladiny plazmatických proteinů a o stanovení aktivity AChE.

Mezi hodnotami TBARS, FRAP a aktivitou glutathionreduktasy je patrná korelace. Data ukazují zvýšenou aktivitu obranných mechanismů organismu vůči oxidační zátěži i jeho aktivní snahu se s ní vyrovnat. V rámci experimentu se tedy podařilo prokázat, že intoxikace i léčba výrazně ovlivňují redoxní rovnováhu organismu. Podání reaktivátorů se jeví účelné pro potlačení oxidačního stresu. Snížené hladiny plazmatických proteinů naznačují negativní vliv intoxikace na funkci jater. Souvislost mezi aktivitou AChE a oxidační zátěží nebyla zaznamenána. Ne vždy jednoznačné výsledky však svědčí o složitosti a komplexnosti probíhajících dějů. Pro jejich porozumění je třeba tuto problematiku do budoucna lépe prozkoumat.

## 8. SEZNAM LITERATURY

1. Akhgari, M., Abdollahi, M., Kebryaezadeh, A., Hosseini, R., Sabzevari, O.: Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2003, roč. 22(4), s. 205-211.
2. Balali-Mood, M., Balali-Mood, K., Hosseini Shirazi, F.: Recent advances in treatment of acute organophosphorous nerve agents poisoning. *Iranian J. Pharm. Res.*, 2006, roč. 5(2), s. 79-87.
3. Benzie, I. F., Strain, J. J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 1996, roč. 239(1), s. 70-76.
4. Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, roč. 72(1-2), s. 248-254.
5. Carlberg, I., Mannervik, B.: Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1975, roč. 250(14), s. 5475-5480.
6. Delfino, R.F., Ribeiro, T.S., Figueroa-Villar, J.D.: Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2009, roč. 20(3), s. 1-22.
7. Fokuto, T. R.: Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.*, 1990; roč. 87, s. 245-254.
8. Grune, T., Schröder, P., Biesalski, H.K.: Low molecular weight antioxidants. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 2005, roč. 2, s.77-90.
9. Jann, M. W., Shirley, K. L., Small, G. W.: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors. *Clin. pharmacokinet.*, 2002, roč. 41(10), s. 719-739.

10. Karasová, J. Ž., Kuča, K., Jun, D., Bajgar, J.: Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při *in vivo* hodnocení účinků reaktivátorů. Chem. Listy, 2010, roč. 104, s. 46-50.
11. Karasová, J. Ž., Kassa, J., Musílek, K., Jung, Y., Kuča, K.: Je fluorace oximů tou správnou cestou k zvýšení průniku těchto látek do centrálního nervového systému? Vojenské zdravotnické listy, 2010, roč. 79(1), s. 23-27.
12. Karatas, F., Karatepe, M., Baysarb, A.: Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem., 2002, roč. 311(1), s. 76-79.
13. Kassa, J., Karasová, J. Ž., Caisberger, F., Bajgar, J.: The influence of combinations of oximes on the reactivating and therapeutic efficacy of antidotal treatment of soman poisoning in rats and mice. Toxicol. Mech. Methods., 2009, roč. 19(9), s. 547-451.
14. Kassa, J., Karasová, J. Ž., Tesařová, S., Kuča, K., Musílek, K.: A comparison of the ability of newly-developed bispyridinium oxime K203 and currently available oximes (trimedoxime, obidoxime, HI-6) to counteract the acute neurotoxicity of soman in rats. Toxicol. Mech. Methods., 2010, roč. 20(8), s. 445-451.
15. Kolečkář, V., Jun, D., Opletal, L., Jahodář, L., Kuča, K.: Assay of radical scavenging activity of antidotes against chemical warfare agents by DPPH test using sequential injection technique. J. Appl. Biomed., 2007, roč. 5(2), s. 81-84.
16. Lincová, D., Farghalli, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. 2. vyd. Praha: Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
17. Łukaszewicz-Hussain, A., Moniuszko-Jakoniuk, J.: Liver catalase, glutathione peroxidase and reductase activity, reduced glutathione and hydrogen peroxide levels in acute intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide. Polish Journal of Environmental Studies, 2004, roč. 13(3), s. 303-309.



18. Lüllmann H., Mohr K., Wehling, M.: Farmakologie a toxikologie. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2002. 694 s. ISBN 80-7169-976-4.
19. Nývltová, Z., Parýzková, J., Čermák, J., Churáček, J.: Analýza organofosforečných otravných látek (OL), jejich prekurzorů a degradačních produktů. Chem. Listy, 1999, roč. 93, s. 181-190.
20. Patočka, J. et al.: Vojenská toxikologie. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004a. 178 s. ISBN 80-247-0608-3.
21. Patočka, J., Cabal, J., Kuča, K., Jun, D.: Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: *in vitro* kinetics and thermodynamics. J. Appl. Biomed., 2005, roč. 3(2), s. 91-99.
22. Patočka, J., Kuča, K., Jun, D.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body. Acta Medica, 2004b, roč. 47(4), s. 215-228.
23. Peter, J. V., Moran, J. L., Pichamuthu, K., Chacko, B.: Adjuncts and alternatives to oxime therapy in organophosphate poisoning - is there evidence of benefit in human poisoning? A review. Anaesth. Intensive Care, 2008, roč. 36(3), s. 339-350.
24. Pohanka, M., Karasová, J. Ž., Musílek, K., Kuča, K., Kassa, J.: Effect of five acetylcholinesterase reactivators on tabun-intoxicated rats: induction of oxidative stress versus reactivation efficacy. J. Appl. Toxicol., 2009, roč. 29(6), s. 483-488.
25. Puntel, G. O., Gubert, P., Peres, G.L., Bresolin L., Rocha J.B., Pereira M.E., Carratu V.S, Soares F. A.: Antioxidant properties of oxime 3-(phenylhydrazono) butan-2-one. Arch. Toxicol., 2008, roč. 82(10), s. 755-762.
26. Racek, J.: Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. 1. vyd. Praha: Galén, 2003. 89 s. ISBN 80-7262-231-5.

27. Ranjbar, A., Pasalar, P., Abdollahi, M.: Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2002, roč. 21(4), s. 179-182.
28. Reiner, E., Radic, Z., Simeon-Rudolf, V.: Mechanisms of organophosphate toxicity and detoxication with emphasis on studies in Croatia. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 2007, roč. 58(3), s. 329-338.
29. Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., Reiter, R. J.: Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.*, 2004, roč. 36(1), s. 1-9.
30. Shulaev, V., Oliver, D.J.: Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. *Plant. Physiol.*, 2006, roč. 141(2), s. 367-372.
31. Stojilkovic, M. P., Jokanovic, M.: Pyridinium oximes: rationale for their selection as causal antidotes against organophosphate poisonings and current solutions for auto-injectors. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 2006, roč. 57(4), s. 435-443.
32. Štěpánková, Š., Komers, K.: Cholinesterase a cholinesterase inhibitors. *Curr. Enzyme Inhib.*, 2008, roč. 4(4), s. 160-171.
33. Štípek, S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2000. 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
34. Tug, T., Karatas, F., Terzi, S. M., Ozdemir, N.: Comparison of serum malondialdehyde levels determined by two different methods in patients with COPD: HPLC or TBARS methods. *Lab. Medicine*, 2005, roč. 36(1), s. 41-44.
35. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, roč. 39(1), s. 44-84.

36. Vidyasagar, J., Karunakar, N. Reddy, M. S., Rajnarayana, K., Surender, T., Krishna, D. R.: Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Indian J. Pharmacol*, 2004, roč. 36(2), s. 76-79.
37. Voicu, V. A., Bajgar, J., Medvedovici, A., Radulescu, F. S., Miron, D. S.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of some oximes and associated therapeutic consequences: a critical review. *J. Appl. Toxikol.*, 2010, roč. 30(8), s. 719-729.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Miroslava Mercová

Konzultant: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Název diplomové práce: Sledování markerů oxidačního stresu po intoxikacích nervově paralytickou látkou a podání reaktivátoru acetylcholinesterasy

V této práci byl sledován vliv otravy somanem a léčby atropinem a vybranými oximovými reaktivátory na redoxní rovnováhu v potkaních erytrocytech, játrech a plazmě. Samci potkanů kmene Wistar byli rozděleni do osmi skupin po šesti zvířatech. Zvířatům v první skupině byl podán pouze atropin, ve druhé skupině soman v množství odpovídajícím 1 x LD<sub>50</sub> a atropin. Zvířatům ve skupinách 3-7 byl podán soman, atropin a oximy buď samostatně (HI-6, trimedoxim, K203), nebo v kombinaci (HI-6 + trimedoxim, HI-6 + K203). Kontrolní (osmá) skupina byla vystavena pouze fyziologickému roztoku.

Ke studiu markerů oxidačního stresu byly vybrány metoda TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), aktivita glutathionreduktasy a metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power). Dále pak byly stanoveny i hladiny plazmatických proteinů a aktivita acetylcholinesterasy.

Experimentální data ukázala signifikantní změny v těchto parametrech. Přítomnost oxidačního stresu je kompenzována zvýšením aktivity obranných antioxidačních mechanismů a koreluje se snížením oxidačního poškození lipidů. Byl rovněž zaznamenán pokles aktivity acetylcholinesterasy, ale korelace mezi aktivitou acetylcholinesterasy a velikostí oxidačního stresu nebyla pozorována.

Podářilo se prokázat, že intoxikace somanem a léčba výše uvedenými oximy je spojena se změnami v redoxních vlastnostech. Na základě uvedeného lze dedukovat, že léčba oximy má pozitivní vliv na potlačení oxidačního stresu.

(Klíčová slova: oxidační stres, organofosfáty, oximové reaktivátory)

## ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Miroslava Mercová

Consultant: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Title of Thesis: Evaluation of oxidative stress markers after intoxication with nerve agents and treatment with acetylcholinesterase reactivators

In this study, the influence of soman poisoning and treatment with atropine and some oximes on redox status in rat erythrocytes, liver and plasma were investigated. Male Wistar rats were divided into eight groups, each of six animals. The first group was exposed to atropine only, the second group to one LD<sub>50</sub> of soman and atropine. The groups 3-7 were treated with soman, atropine and one of named oximes (HI-6, trimedoxime, K203) or with their combinations (HI-6 + trimedoxime, HI-6 + K203). The control (eighth) group was treated with saline solution only.

To study the markers of oxidative stress the TBARS method (thiobarbituric acid reactive substances), glutathion reductase activity and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) method were chosen. There was plasma protein content and acetylcholinesterase activity assessed, too.

The experimental data showed significant alterations in followed parameters. The presence of oxidative stress is offset by enhanced activity of defense antioxidative mechanisms and it corresponds with the decreased of oxidative damage of lipids. Reduced acetylcholinesterase activity was registered, but there is not significant correlation between acetylcholinesterase activity and oxidative stress.

It was demonstrated that the poisoning by soman and treatment by above listed oximes is associated with changes in redox status. It could be inferred that the treatment by oximes has a positive influence on suppression of oxidative stress.

(Key words: oxidative stress, organophosphates, oxime reactivators)