

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**Sledování aktivit cholinesteráz při experimentálně navozených otravách
organofosforovými sloučeninami**

**Cholinesterase activity following experimentally induced
organophosphorus poisoning**

Diplomová práce

Vedoucí práce : Doc. MUDr. Josef Herink, DrCs.

Hradec Králové 2007

Irena Svobodová

OBSAH

1	ABSTRAKT	- 4 -
2	ABSTRACT	- 5 -
3	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 6 -
4	TEORETICKÁ ČÁST	- 7 -
4.1	ENZYMY.....	- 7 -
4.1.1	ENZYMOVÁ AKTIVITA.....	- 7 -
4.2	CHOLINESTERÁZY.....	- 8 -
4.2.1	BUTYRYLCHOLINESTERÁZA.....	- 9 -
4.2.2	ACETYLCHOLINESTERÁZA.....	- 9 -
4.2.3	KLINICKÝ VÝZNAM ENZYMŮ.....	- 11 -
4.3	INHIBITORY CHOLINESTERÁZY.....	- 12 -
4.3.1	AKTIVNÍ INHIBITORY.....	- 12 -
4.3.1.1	Acylojící inhibitory.....	- 12 -
4.3.1.2	Karbamáty.....	- 13 -
4.3.1.3	Organofosfáty.....	- 15 -
4.3.2	NEREAKTIVNÍ INHIBITORY.....	- 27 -
4.3.2.1	Nekvartérní inhibitory.....	- 27 -
4.3.2.2	Kvartérní inhibitory.....	- 28 -
4.4	REAKTIVÁTORY CHOLINESTERÁZY.....	- 29 -
4.5	CÍL PRÁCE.....	- 33 -
4.6	METODY STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERÁZ.....	- 34 -
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 36 -
5.1	MATERIÁL.....	- 36 -
5.1.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	- 36 -
5.1.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	- 36 -
5.2	METODIKA.....	- 37 -
5.2.1	ELLMANOVA METODA.....	- 37 -
5.2.2	HOMOGENIZACE.....	- 40 -
5.3	PODMÍNKY EXPERIMENTU PRO RVX.....	- 40 -
5.4	PODMÍNKY EXPERIMENTU PRO SOMAN.....	- 40 -
5.5	IN VIVO EXPERIMENT.....	- 41 -
5.5.1	RUSKÁ VX LÁTKA.....	- 42 -
5.5.1.1	Experiment I. – sledování farmakokinetiky RVX.....	- 42 -
5.5.1.2	Experiment II. – srovnávání účinnosti terapeutických kombinací.....	- 48 -
5.5.2	SOMAN.....	- 53 -
6	VÝSLEDKY	- 58 -
6.1	RVX.....	- 58 -
6.1.1	VÝSLEDKY EXPERIMENTU I.....	- 58 -
6.1.2	VÝSLEDKY EXPERIMENTU II.....	- 58 -
6.2	SOMAN.....	- 59 -
7	DISKUZE	- 60 -
8	POUŽITÁ LITERATURA	- 62 -

Chtěla bych velice poděkovat svému školiteli Doc. Mudr. Josefu Herinkovi, DrSc. za odborné vedení, cenné připomínky a rady při zpracování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat svému externímu školiteli Mgr. Danu Junovi, PhD. a celému kolektivu Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové, který mě provedl experimentální částí, naučil mě pracovat s biologickým materiálem a zajistil mi odborné a příjemné prostředí pro vykonání práce.

Na závěr bych chtěla poděkovat i svým nejbližším za jejich podporu nejen při zpracování této práce, ale i za podporu a sílu, kterou mi dávali během celého studia.

1 ABSTRAKT

Předmětem práce bylo srovnání účinnosti vybraných oximů při antidotní terapii modelové intoxikace somanem a ruskou VX látkou. Všechny pokusy byly provedeny na samcích laboratorního potkana kmene Wistar. Oximy byly podávány i.m. a to jak jednotlivě, tak v kombinaci s atropinem. Odběry mozků pro vyšetření aktivity AChE byly prováděny v několika časových intervalech. Testované oximy (pralidoxim, obidoxim, HI-6) prokázaly rozdílnou schopnost reaktivace inhibované acetylcholinesterázy. Nejefektivnějším antidotním prostředkem intoxikace somanem i ruskou VX látkou byl oxim HI-6.

2 ABSTRACT

The aim of present work was a comparison of effectiveness of oximes chosen in the experimental therapy of nerve agents intoxication (soman and russian VX). All experiments were performed in male Wistar rats. All oximes tested were administered intramuscularly either in a separate injection or in combination with atropine. The preparation of the brain parts for determination of acetylcholinesterase was performed in several time intervals after drugs tested administration. Antidotal potency of oxime HI-6 was superior in comparison with the rest of oximes tested.

3 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimer's disease, Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloid prekursor protein
ATR	atropin
BuChE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervový systém
CSF	cerebrospinal fluid, cerebrospinální tekutina
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyselina, Ellmanovo činidlo
GIT	gastrointestinální trakt
HCl	kyselina chlorovodíková
HEB	hematoencefalická bariéra
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CHE	cholinesteráza
i.m.	intramuskulární aplikace
i.v.	intravenózní aplikace
M – receptor	muskarinový receptor
NPL	nervově paralytické látky
OF	organofosfáty
OPID	organophosphate – induced delayed polyneuropathy
2-PAM	pralidoxim
p.o.	perorální aplikace
RVX	ruská VX látka
T0 048	obidoxim

4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 ENZYMY

Enzymy jsou specifické biologické katalyzátory, které řídí v živých organismech metabolické pochody a podílí se na regulaci a vzájemné koordinaci životně důležitých funkcí. Jsou to ve své podstatě proteiny, které jsou schopny snižovat aktivační energii některých chemických reakcí a tím je i urychlit. Děje se tak složitými mechanismy na komplikovaných površích enzymů, které vytváří vhodné prostředí pro zdárný průběh chemických reakcí, které jsou součástí metabolismu. Významným místem každého enzymu je tzv. katalytické centrum, místo, kde dochází k navázání chemické látky (substrátu) a její přeměně na látku jinou (produkt). Dnes je známo několik tisíc enzymů a každý organismus má své specifické enzymy, které se podílí na metabolických procesech.

4.1.1 ENZYMOVÁ AKTIVITA

Enzymovou aktivitu, tedy rychlost přeměny substrátu na produkt, je možno ovlivňovat (řídit) účinkem látek, tzv. enzymových efektorů, které se váží na katalytické centrum enzymu nebo na některá jiná vazebná místa (tzv. allosterická). Efektory mohou enzymovou reakci zpomalit čili inhibovat (enzymové inhibitory, také inhibitory), nebo naopak urychlit (enzymové aktivátory). Vazba efektorů na enzym může být reverzibilní či ireverzibilní a efektorová molekula může či nemusí soutěžit se substrátem o vazebné místo (kompetitivní a nekompetitivní inhibitory). Interakce enzymů s efekty, z nichž převážná část vystupuje ve funkci inhibitorů, lze popsat kinetickými rovnicemi a charakterizovat řadou enzymových konstant. Pro reverzibilní inhibitory je nejdůležitější konstantou disociační konstanta komplexu enzym-inhibitor (K_i), jejíž obdoba je u ireverzibilních inhibitorů hodnota I_{50} , udávající koncentraci inhibitoru, při níž dochází k 50 procentní inhibici enzymu.

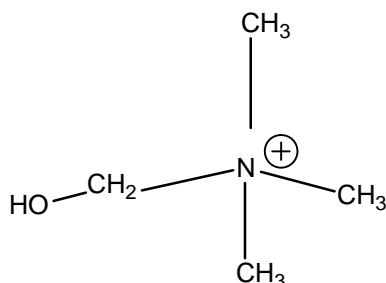
Pomocí efektorů lze významným způsobem ovlivňovat aktivitu enzymů a řídit tak biochemické reakce a jimi ovládané nebo řízené biologické funkce. Tímto způsobem je realizován farmakologický účinek řady léků a také toxický účinek mnoha chemických látek.

Pokud působí nějaká látka jako inhibitor s kovalentní vazbou na fyziologicky důležitý enzym, lze očekávat, že bude toxická.¹

4.2 CHOLINESTERÁZY

Cholinesterázy patří do skupiny serinových hydroláz štěpících esterovou vazbu- štěpí estery cholinu.

Cholin:



U teplokrevných organismů existují dva typy cholinesteráz. Podle toho, který ester cholinu štěpí, rozeznáváme pravou acetylcholinesterázu (AChE, EC 3.1.1.7) a pseudocholinesterázu (butyrylcholinesterázu; BuChE, 3.1.1.8).

Kromě AChE a BuChE existují v organismu ještě další esterázy, které byly charakterizovány jako samostatné typy. Patří mezi ně např. benzoylcholinesteráza, která má největší afinitu k benzoylcholinu, dále acylesterázy, štěpící acylestery, lipáza, která má vysokou afinitu k esterům mastných kyselin, a fosfolipáza, která hydrolyzuje fosfolipidy. Pro úplnost, je nutné uvést i pektinesterázu, štěpící pektinové estery s cholesterolesterázu, která se účastní rozkladu esterifikovaného cholesterolu.

4.2.1 BUTYRYLCHOLINESTERÁZA

BuChE byla nalezena v tělních tekutinách, je lokalizována v játrech, v krevní plazmě pankreatu, v endotelu kapilár v CNS apod. Není to zcela specifický enzym a má optimum účinku až při vysokých koncentracích substrátu. Kromě výskytu v organismu se liší od AChE i afinitou k substrátům či inhibitorům. Navíc je její molekula tvořena jen jedním polypeptidickým řetězcem, obsahujícím asi 25 % sacharidů. Existuje ve více než devíti isomerních formách.

Je syntetizována v mnoha tkáních, včetně jater, plic, srdce a mozku. V současnosti je známa její role v metabolismu lipoproteinů, úloze při udržování myelinu, buněčné adhezi a neurogenezi, zčásti jako scavenger toxických molekul. Má také důležitou roli při biotransformaci některých léčiv, např. lokálních anestetik prokainu, amethokainu, bupivakainu, dále suxamethonia anebo jiných sloučenin jako aspirin.

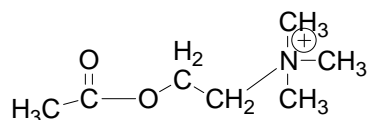
V lidském mozku se nachází v neuronech, gliích, destičkách a klubcích u Alzheimerovy choroby (viz dále).

4.2.2 ACETYLCHOLINESTERÁZA

AChE je fyziologicky důležitý enzym, bez níž by nemohl fungovat cholinergní nervový systém. Je substrátově vysoce specifický a vždy vázaný na buněčné struktury. Je lokalizovaný v neuronech, zejména na synapsích, v erythrocytech, srdci, nervosvalové ploténce. Je to membránově-ohraničený glykoproteid existující v několika molekulárních formách. V nativním stavu je molekula složena ze dvou řetězců alfa a ze dvou řetězců beta a je tedy tetrametr. Jeho syntéza je úzce spjata s cyklem erytrocytů a již je možná i syntéza biotechnologickým postupem. Poměrné zastoupení AChE a BuChE v lidském organismu je 8 : 2.

Substrátem pro AChE je acetylcholin (ACh)- neuromediátor cholinergního systému. ACh je syntetizován z exogenně dodávaného cholinu (potravou), který je acetylován pomocí acetylkoenzymu A. Tuto reakci katalyzuje enzym cholinacetyltransferáza. Po syntéze je ACh skladován v tzv. synaptických váčcích pro potřeby synaptického přenosu vzruchu.²

acetylcholin



Bezprostřední úloha AChE tkví v hydrolyze ACh na kyselinu octovou a cholin. Enzymatická hydrolyza ACh se uskutečňuje na aktivním centru AChE. Nejdůležitějším místem aktivního povrchu AChE je tzv. katalytické centrum, které je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu (tzv. esteratické místo) a karboxylovou skupinou kyseliny glutamové (tzv. α -anionické místo). Dále se na aktivním povrchu nachází ještě jedno anionické místo, označované jako β , které je rovněž tvořeno karboxylovou skupinou. Toto β -anionické místo bývá také nazýváno jako periferní anionické místo, resp. místo akcelerační, neboť navázáním některých efektorů na toto místo, např. kalcia, je urychlena hydrolyza ACh. V blízkosti esteratického centra je ještě tzv. oblast hydrofobních interakcí, tvořená seskupením hydrofobních aminokyselin.

Katalytické centrum se s největší pravděpodobností nachází na jednom ze dvou polypeptidických řetězců AChE, a to na řetězci alfa, zatímco β -anionické místo a hydrofobní oblast jsou na řetězci beta. Vazebná místa na β -řetězci lze považovat za místa allosterická, neboť jejich obsazení efektorů, ať už inhibitory či aktivátory, ovlivňuje aktivitu enzymu allosterickým mechanismem.³ BuChE štěpí ACh oproti AChE poloviční rychlostí. Pokud je však AChE inhibována, pak ACh zůstává v místech nervového zakončení, nervový vzruch se dále přenáší, což má za následek počáteční křeč svalstva.⁴

ACh po i.v. injekci či infúzi zvířeti či člověku způsobuje příznaky vyvolané stimulací postgangliových parasympatických receptorů (M-receptorů): snižování krevního tlaku negativně chronotropním účinkem a nepřímo vyvolanou vasodilatací (zprostředkovanou endotelem), dále negativně inotropní účinek na síně, bronchokonstrikci, zvýšení tonu střevní svaloviny, stimulaci svaloviny močového měchýře, zvýšenou sekreci žláz, stimulaci žaludeční sekrece kyselin a pepsinogenu. Nikotinové receptory ganglií a nervosvalové ploténky jsou relativně méně citlivé. Farmakologický účinek trvá velmi krátce, protože ACh se velmi rychle rozkládá. Pro velmi rychlou inaktivaci se tedy ACh k terapeutickému užití nehodí.

4.2.3 KLINICKÝ VÝZNAM ENZYMŮ

Aktivita AChE i BuChE není jednotná a má své individuální výkyvy. Je možné říci, že kolísání aktivity AChE v erytrocytech nepodléhá v porovnání s plazmovou BuChE takové variabilitě jako plazmová BuChE. Při dlouhodobém sledování aktivity cholinesteráz bylo prokázáno, že aktivita erytrocytární AChE u mužů kolísá v rozmezí $\pm 8\%$ a $\pm 12\%$ u žen během jednoho roku. Pro BuChE byl tento rozdíl větší, za rok to bylo $\pm 25\%$ u mužů a $\pm 24\%$ u žen. Některá léčiva mohou erytrocytární aktivitu zvyšovat, např. kontraceptiva.

Klinické stanovení aktivity cholinesteráz v krvi či jiných orgánech má význam pro určení či upřesnění diagnózy různých patologických stavů.

Aktivita obou enzymů je ovlivněna pohlavím - u žen je aktivita plazmové BuChE i erytrocytární AChE nižší než u mužů, věkem-do dospělosti aktivita obou enzymů stoupá a po padesátém deceniu naopak klesá, takže po 60. roce věku většinou nejsou rozdíly mezi aktivitou AChE či BuChE u mužů a u žen. Aktivitu obou enzymů ovlivňuje také výživa- u nízkenergetické diety, u nedostatku proteinů, je aktivita obou enzymů snížena asi o jednu čtvrtinu. Navíc byly u erytrocytární AChE při nízkenergetické dietě pozorovány i její změněné vlastnosti.

Aktivita AChE je dále ovlivňována hormonálními vlivy - např. hypotyreózou (pokles aktivity), adrenalectomií (zvýšení), kastrací (snížení) apod. Také v časných fázích stresu bylo pozorováno zvýšení enzymatické aktivity.²

4.3 INHIBITORY CHOLINESTERÁZY

Inhibitory cholinesterázy zpomalují rozklad ACh, protože v závislosti na koncentraci blokují štěpení molekul mediátoru ACh. Na základě zvolených kritérií je můžeme dělit do několika skupin:

- § reverzibilní / ireverzibilní
- § reaktivní / nereaktivní
- § dle chemické struktury

Reverzibilní inhibitory, převážně sloučeniny obsahující kvartérní dusík, vytváří energeticky slabší vazbu na AChE reverzibilního nebo allosterického charakteru. Při interakci se obecně uplatňují vazby elektrostatického či elektrokinetického charakteru. Ireverzibilní inhibitory, jako jsou estery kyseliny fosforečné typu organofosfátů, dokáží ireverzibilně fosforylovat esteratické centrum cholinesterázy. Některé z nich však jsou chemicky labilní, takže se v životním prostředí rychle rozpadají.

Inhibitory AChE :

– reaktivní :

- § acylující inhibitory
- § karbamáty
- § organofosfáty a organofosfonáty

-nereaktivní :

- § nekvartérní látky
- § kvartérní látky

4.3.1 AKTIVNÍ INHIBITORY

4.3.1.1 ACYLUJÍCÍ INHIBITORY

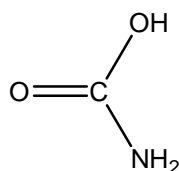
Acylující inhibitory interagují s AChE obdobně jako ACh. Blokáda enzymu je krátkodobá a plně reverzibilní. Tyto látky obsahují ve své struktuře skupinu kyseliny octové. Zbytek této kyseliny se naváže na serinový hydroxyl esteratického centra. Vznikne tak acetylovaná AChE, která je reaktivována hydrolytickým odštěpením kyseliny octové.

4.3.1.2 KARBAMÁTY

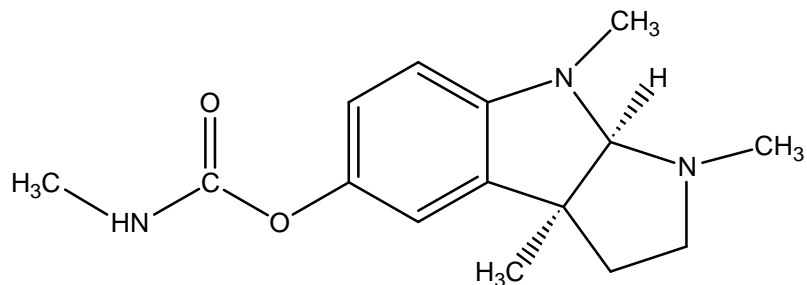
Karbamáty jsou obecně estery karbamové kyseliny. Nejdéle známý a široce používaný inhibitor AChE byl přírodní alkaloid fysostigmin, který je obsažen ve *Physostigma venenosum*, rostlině rostoucí v západní Africe. Dalších tisíce karbamátů byly pak syntetizovány, když byla objevena anticholinesterázová aktivita fysostigminu a objasněn význam N-metyl karbamové skupiny pro jeho biologickou aktivitu. Z chemického hlediska jsou až na výjimky N-metyl nebo N,N-dimetylkarbamáty. Některé z nich, převážně ze skupiny N-metylkarbamátů jsou používány jako insekticidy – karbaryl, moban, isolan, atd. Jiné našly uplatnění v humánní a veterinární medicíně – miotin, pyridostigmin, syntostigmin.⁵

Pro jejich podobnost s molekulou ACh nepřekvapuje, že reagují s cholinesterázou. Primární kontakt nastává vždy mezi kationickým dusíkem inhibitoru a tzv. anionickým centrem enzymu. Vzniklý karbamoylderivát komplex (karbamoyl + AChE) podléhá rychle dekarbamoylaci (tj. reaktivaci) nukleofilním účinkem vody. Teprve po ztrátě navázané kyselé skupiny je esteráza opět schopna další reakce. Poločasy dekarbamoylace pro metyl- a dimetylkarbamylovanou AChE se pohybují kolem 40 min, což má za následek, že o karbamátech hovoříme jako o pseudoireverzibilních inhibitech AChE. Dekarbamoylaci navíc nelze urychlit účinkem reaktivátorů, neboť tyto jsou účinné jen u fosforylovaného enzymu. Pokud karbamáty neobsahují v molekule kvartérní dusík, vstřebávají se rychle plicemi, GITem, méně kůží. Jsou poměrně stabilní ve vodných roztocích, ale v organismu mohou být rozkládány nespecifickými esterázami, stejně jako cholinesterázou. Proto je jejich účinek závislý hlavně na stabilitě komplexu karbamát-enzym a ani ne tak na metabolismu nebo rychlosti vylučování. Inhibiční aktivita je podmíněna i strukturou látky a substitucí jednoho z atomů vodíku benzenového jádra alkylem či halogenem. Substituce má za následek zvýšení inhibiční mohutnosti karbamátu, přestože tato část molekuly inhibitoru představuje odstupující část karbamátu. Špatně procházejí hematoencefalickou bariérou, a tak jsou centrální symptomy minimální. Při intoxikaci je specifickým antidotem adekvátní dávka atropinu.⁶

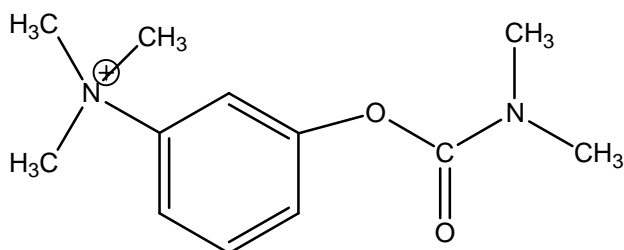
Všechny tyto látky obsahují v molekule skupinu karbamové kyseliny.



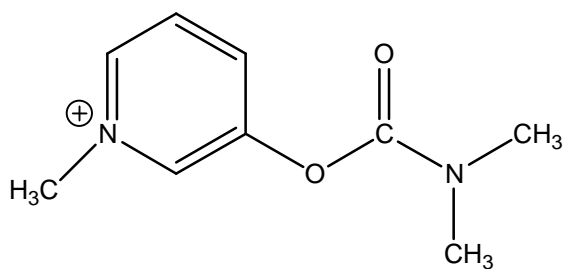
Fysostigmin se používá především v očním lékařství a pro snížení nitroočního tlaku



Neostigmin se používá při myasthenia gravis, postoperační atonii střev a močového měchýře, jako miotikum a při glaukomu



Pyridostigmin našel použití jako profylaktikum otrav NPL



4.3.1.3 ORGANOFOSFÁTY (OF)

OF jsou synteticky připravované sloučeniny. Jediný přírodně se vyskytující OF je anatoxin-a (s), toxický produkt některých cyanobakterií. Všechny ostatní – syntetické OF – jsou pesticidy, nervově paralytické látky (NPL), změkčovadla plastických hmot nebo přísady do hydraulických kapalin.

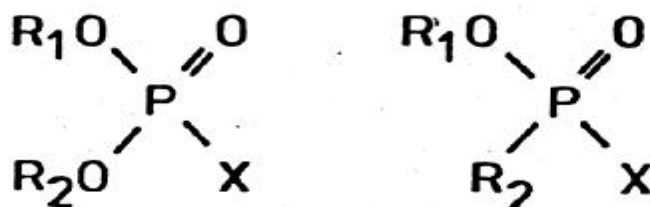
První vysoce toxické OF byly připraveny v Německu a Velké Británii v období druhé světové války. Největší expanze syntézy a vývoje nových sloučenin byla v padesátých a šedesátých letech 20. století. OF, jako pesticidy, se v zemědělství a lesním hospodářství užívají již po dlouhou dobu.⁵ Některé mají velmi silné insekticidní účinky a po použití se velmi rychle rozpadají. Nevýhodou OF, jako insekticidních přípravků, je jejich vysoká akutní toxicita pro člověka a vyšší rostliny. Jako vysoce lipofilní látky se v případě, že neobsahují v molekule kvartérní dusík

(např. echothifonát) velice rychle absorbují. Do organismu se dostávají všemi cestami včetně spojivek a neporušené kůže. Perkutánní absorpci navíc usnadňují různá rozpouštědla (chlorované uhlovodíky, xylene, toluen), která jsou součástí insekticidních přípravků, ve kterých se OF jako emulzní koncentráty dostávají do distribuční sítě.⁶ Předností je jejich chemická labilita, takže zemědělské produkty jsou požitelné již za krátkou dobu po ošetření, při nízkém riziku jejich případné kumulace v organismu. Insekticidní účinek je vyvolán stejným molekulárním mechanismem jako toxicita pro teplokrevné živočichy.

OF, označované jako nervově paralytické látky, se vyznačují vysokou toxicitou a jsou nejvýznamnější a nejnebezpečnější skupinou bojových chemických látek. Vysoká toxicita je způsobena rychlým nástupem účinku a průnikem do organismu všemi branami vstupu. Dělí se na dvě velké skupiny, které jsou obecně označovány jako G-látky a V-látky. G-látky jsou bezbarvé, pohyblivé kapaliny podobné vodě, charakteristické vysokou těkavostí, takže nejpravděpodobnější branou vstupu jsou dýchací cesty. Mezi G-látky patří: tabun, sarin, cyklosin a soman. V-látky jsou toxičtější než G-látky. Největšího významu dosáhla VX látka, která je v chemicky čistém stavu bezbarvá, bez výraznějšího zápachu s velmi nízkou těkavostí, takže vydrží ve vodě a v terénu velmi dlouhou dobu (týdny až měsíce). Podobné vlastnosti má v Rusku zavedený analog látky VX označovaný jako VR.⁷

Nejvýznamnějšími reprezentanty organofosforových inhibitorů AChE z hlediska chemické stavby jsou dialkylfosfáty a dialkylfosfonáty, případně jejich thioanaloga.

Obecná struktura :

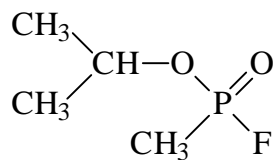


R₁ a R₂ jsou nejčastěji alifatické alkyly

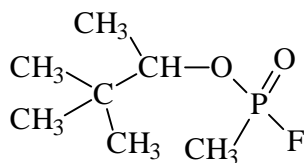
X je tzv. odstupující skupina, která se při interakci OF s AChE odštěpí a zbývající acyl se naváže na esteratické místo enzymu. Funkci odstupující skupiny může plnit např. halogen, nejčastěji fluór, nitrilová skupina, substituovaný merkaptan atd.

Vzorce vybraných NPL:

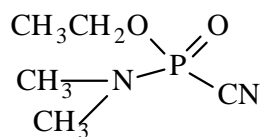
Sarin



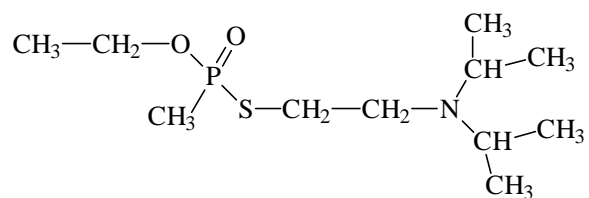
Soman



Tabun



VX látka



Vztahy mezi strukturou a účinkem ve skupině OF lze shrnout takto:

- § estery fosfonové kyseliny bývají toxičtější než analogické estery fosforečné kyseliny
- § sloučeniny s jednou vazbou P-N bývají toxičtější než sloučeniny s dvěma vazbami tohoto typu
- § toxicita klesá v řadě F, I, CN
- § oxosloučeniny jsou toxičtější než jejich thioanaloga

Interakci organofosforového inhibitoru s AChE lze vyjádřit zjednodušeným schématem:

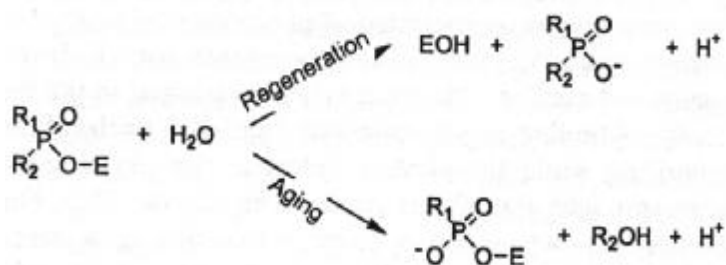


Ve schématu představuje E enzym AChE, PX je OF a EPX je přechodný komplex, ze kterého vzniká fosforylovaný enzym a odstupující skupina. Síly vytvářející EPX komplex nemají charakter kovalentních vazeb. Inhibitor je na enzym nejprve poután nekovalentními vazbami a je orientován tak, aby mohlo v další fázi dojít k vytvoření chemické vazby mezi atomem kyslíku enzymu a atomem fosforu OF. Fosforylovaný enzym EP není ve všech případech zcela stálý. Jednak může být, i když jen velmi zvolna, defosforylován účinkem vody za obnovení enzymatické aktivity, což nazýváme spontánní hydrolýzou, a jednak může podléhat tzv. dealkylaci, kdy jedna z alkoxylových skupin je účinkem vody odštěpena ve formě alkoholu.³ Spontánní hydrolýza za vytvoření volného enzymu probíhá kinetikou 1. řádu s ohledem na [EP], protože koncentrace vody je relativně velmi vysoká a závislá na enzymu, teplotě, pH, iontovém náboji a zejména na druhu fosforylované skupiny. Dealkylace, známá pod názvem stárnutí enzymu (aging), kdy permanentně inhibovaná AChE spontánně neregeneruje, ani nepodléhá reaktivaci, probíhá také kinetikou 1.řádu. Rychlost stárnutí je závislá na AChE a na fosforylované skupině. Poločas stárnutí např. u diethylfosforylované AChE je 41 hodin, ve srovnání s diisopropylfosforylovanou AChE, která má poločas stárnutí 4,6 hodiny. Některé skupiny stárnou s alarmující rychlostí, např. poločas stárnutí u nervově paralytické látky soman v hovězí erytrocytární AChE, je pouze 6 min. při 25°C a pH 7,4. Výsledek stárnutí je tedy závislý především na substituci fosforu alkyly.⁵

Jako bojové látky se vyvíjí sloučeniny, kde proces stárnutí probíhá velmi rychle, takže záhy po vytvoření komplexu EPX již není možné enzym reaktivovat.

Nejrychleji probíhá dealkylace u AChE inhibované somanem, kdy nejprve vzniká O-pinakolylyl-methylfosfonylovaná AChE a po dealkylaci za odštěpení pinakolylylalkoholu methylfosfonylovaný enzym. Poločas této reakce činí řádově několik minut. Poločas dealkylace u sarinem inhibované AChE se udává řádově kolem 10 hodin.²

Obr.1 popisuje proces stárnutí

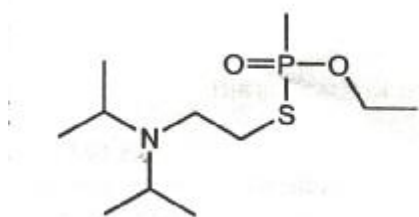


zdroj: Patočka J., Kuča K., Jun D., 2004, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase-important enzymes of human body⁵

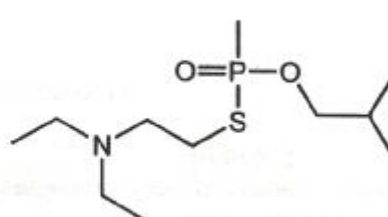
Jelikož se práce týká měření aktivity AChE po otravě ruskou VX látkou (RVX) a somanu, zmínila bych se konkrétněji o těchto dvou látkách.

Ruská VX látka je strukturálním analogem VX látky. Odlišuje se od VX látky dvěma alkylovými skupinami. Navíc je v životním prostředí stálejší než VX látka.

VX látka



Ruská VX

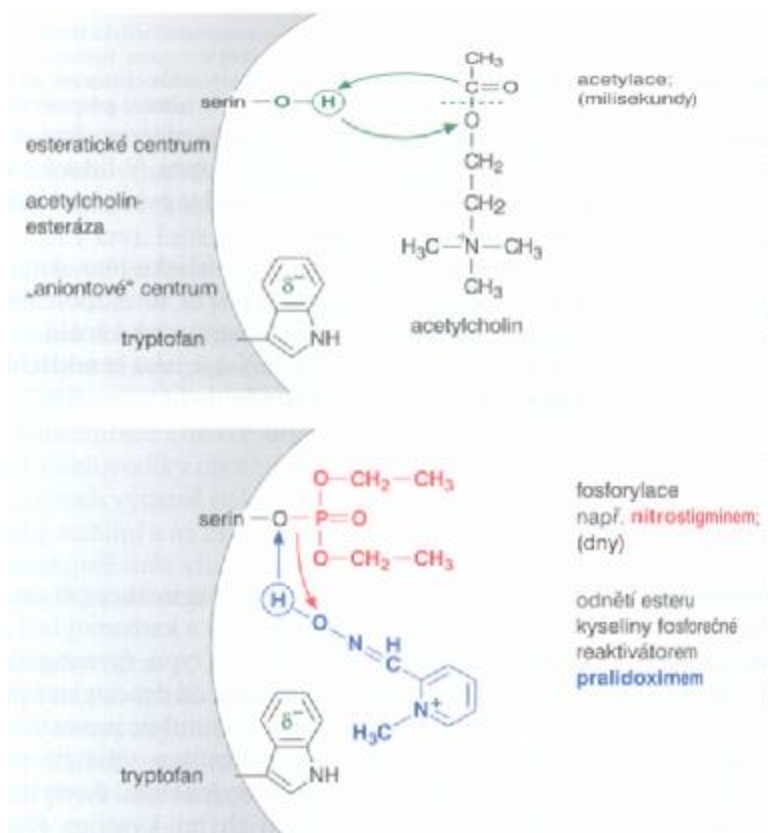


V současné době byla testována reaktivační schopnost neužívanějších oximů (tzn. pralidoxim, obidoxim, HI-6) reaktivovat AChE inhibovanou látkou RVX a eliminovat příznaky intoxikace touto látkou in vivo. Bylo zjištěno, že erytrocytární a mozkovou AChE inhibovanou in vivo látkou RVX reaktivuje nejúčinněji na periférii oxim HI-6, zatímco v centrálním kompartmentu byla účinnost ostatních reaktivátorů až na nepatrné rozdíly stejná. Oxim HI-6 je tedy považován za nejefektivnější k terapii akutních toxických účinků způsobených ruskou VX látkou a také v případě otravy způsobené sarinem, cyklosarinem či somanem. Pokusy byly provedeny na králíčích mozcích a krvi a dále na potkanech, kdy laboratorním zvířatům byl po otravě ruskou VX látkou i.m. podán atropin v dávce 21mg/kg samotný či v kombinaci s jedním oximem.⁸

Soman

Soman (O-Pinacolyl-metyl-fosfonyl-fluorid) je fluoridovaný organofosfát, známý též pod označením GD, patřící do G-skupiny chemických látek. Byl objeven v roce 1944 Richardem Kuhnem v Německu, je to jeden z posledních válečných objevů (cyklosin GF byl objeven až po roce 1949). Označení GD dostal soman až po válce (GC bylo používáno v medicíně), kdy byly Sověty v německých archivech objeveny informace, týkající se somanu. Je to těkavá, korozivní a bezbarvá kapalina mdlého zápachu, pokud je znečištěna, pak se zbarvuje od žluté do hnědé barvy a má silnější zápach.⁹ U myší intoxikovaných somanem v subletální dávce byla sledována po dobu minimálně 90 dní jejich hmotnost. První relativní ztráta hmotnosti (cca 20%) nastala již po 3 dnech intoxikace, histopatologicky pak bylo prokázáno poškození hippokampu.¹⁰

Mechanismus účinku je demonstrován na Obr. 2 - estery kyseliny fosforečné jsou inhibitory cholinesteráz: znemožňují štěpení ACh a organismus sám sebe intoxikuje.



Zdroj: Lullmann, H., Mohr, K., Wehling, M., 2002. Farmakologie a toxikologie, Grada, ¹¹

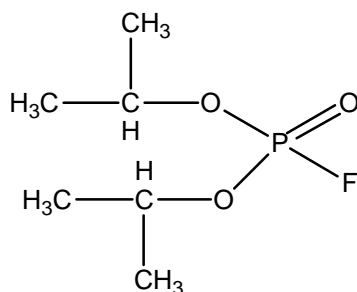
ACh je štěpen AChE v okamžiku, kdy reaguje s dvěmi aktivními centry esterázy. Účinek OF spočívá v kovalentní vazbě fosforu na hydroxylové skupině molekuly serinu v esteratickém centru AChE. Tato fosforylace centra odpovídá acetylaci, což je přirozená reakce při enzymatické hydrolýze ACh. Defosforylace na rozdíl od deacetylace probíhá tak pomalu, že simuluje ireverzibilní poškození enzymu. Aktivní centrum totiž už není k dispozici pro hydrolýzu ACh. ACh není „schopen“ vytěsnit zbytek kyseliny fosforečné od enzymu. OF jsou tedy ve vztahu k ACh nekompetitivními inhibitory .

Aktivita cholinesteráz se obnoví až po syntéze molekul enzymu de novo. Trvá přibližně 50 dní, než AChE v mozku plně regeneruje. Poněvadž bezjaderné erythrocyty nejsou schopny syntetizovat bílkoviny, zotaví se jejich enzymová aktivita až po nahrazení otrávených buněk novými erythrocyty- tj. až asi za 100 dní. Lidská erythrocytární AChE může být využívána k testování účinnosti nových oximů. Nebezpečné příznaky otravy vymizí již v okamžiku, kdy se obnoví přibližně 10% cholinesterázové aktivity v mozku, což je množství, které stačí pro záchranu života. Některé OF, používané jako insekticidy, disociují spontánně od esterického centra esterázy, takže ve srovnání s ireverzibilními inhibitory trvá otrava těmito látkami kratší dobu.

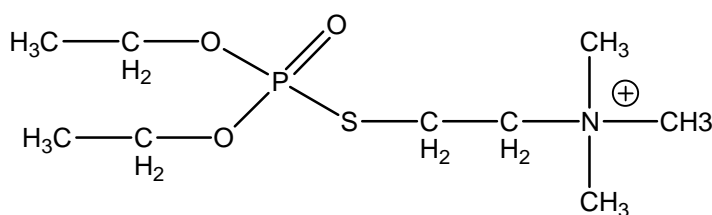
Příklady těchto látek:

- § Fluostigmin (DFP) představitel s jednoduchým základním mechanismem účinku: po odštěpení fluoru se fosfor naváže na hydroxylovou skupinu molekuly serinu v aktivním centru cholinesterázy. To způsobí inhibici enzymu. Postižena je také BuChE a další enzymy, které v aktivním centru obsahují molekulu serinu. Příznaky otrav určuje výhradně blokáda AChE.
- § Nitrostigmin (E 605, parathion) až v organismu in vivo je síra nahrazena kyslíkem (paraoxon) a tím teprve vznikne látka s vysokou afinitou k esteráze.
- § Ekothiopat, zvláštnost - postranní řetězec obsahující dusík (cholin), který je přitahován k aniontovému centru cholinesterázy.

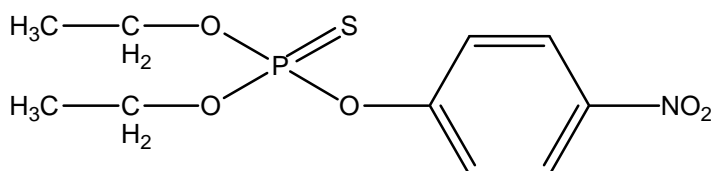
Fluostigmin



Ekothiopat



Nitrostigmin (parathion)



Projevy intoxikace organofosfáty

Podstatou klinického obrazu otravy OF je nahromadění ACh v místech jeho fyziologického účinku. Podle toho, na kterých receptorech nastává nahromadění ACh a tedy nadměrný přenos vzruchů na periférii, rozdělují se klinické příznaky otravy na muskarinové, nikotinové a centrální. Nástup příznaků intoxikace a jejich intenzita závisí na dávce a cestě vstupu OF do organismu. Při inhalaci se příznaky objevují již po několika minutách, při p.o. požití za 15 min až 1 hodinu, po kožní absorpci za 2-3 hodiny. Smrt v případě těžkých akutních otrav nastává následkem bronchospasmu nebo paralýzy příčně pruhovaného svalstva (především bránice). Vědomí bývá obvykle dlouho zachované.

§ Muskarinové účinky

GIT	salivace, ↑ sekrece, ↑ tonus a motilita střev (abdominální křeče, zvracení, diarea)
močový měchýř	inkontinence moči
oko	slzení, mióza
bronchy	↑ bronchiální sekrece, bronchokonstrikce, pulmonální edém
kůže	pocení
kardiovaskulární systém	bradykardie, hypotenze

§ Nikotinové účinky

Tyto příznaky jsou charakterizovány svalovou ochablostí, fibrilacemi, fascikulacemi, nejprve jednotlivých svalů, a pak i svalových skupin přecházejícími v tonicko-klonické křeče a později svalovou ochablostí s přechodem v parézu až paralýzu svalstva. Následkem toho dochází ke značnému omezení ventilace (křeče a později paralýza dýchacích svalů), která je prohlubována bronchokonstrikcí a zvýšenou bronchiální sekrecí.

§ Centrální příznaky

Jsou charakterizovány bolestmi hlavy, úzkostí, emoční labilitou, neklidem, nesnadnou koncentrací, závratěmi, ataxií a bezvědomím. Tyto příznaky jsou typické pro akutní stádium otravy a vyvíjejí se v závislosti na dávce a délce expozice během několika málo minut až hodin. Jejich intenzita je také závislá na době kontaktu, na dávce a na druhu použitého OF.²

Nutný postup při terapii otrav OF :

- § blokáda periferních a centrálních muskarinových receptorů atropinem. Potřebné dávky jsou velmi vysoké (30-100 mg v jednotlivé dávce, v extrémních případech až 400 mg v infuzi za 1 den), protože atropin prostupuje hematoencefalickou bariérou jen velmi pomalu.
- § reaktivace AChE oximy
- § přerušení centrálně vyvolaných křečí tlumícími látkami (diazepamem)
- § řízené dýchání
- § potlačení acidózy podáváním pufovacího roztoku Tris a NaHCO_3
- § symptomatické léčení silné bronchiální sekrece

Pozdní následky otrav organofosfáty

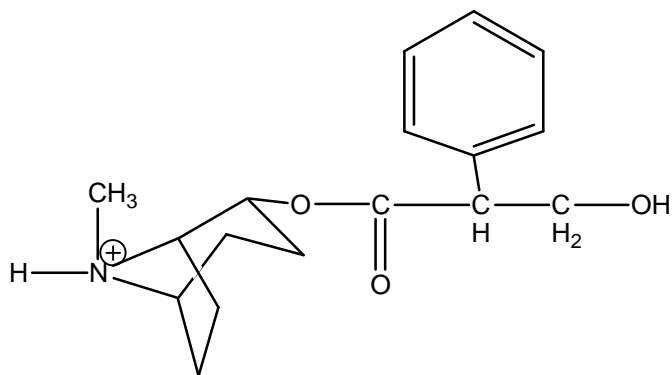
Po opakovaném přívodu určitých inhibitorů cholinesterázy typu OF, obsahujících fluor a při jednorázovém nebo opakovaném přívodu inhibitorů nespecifické cholinesterázy (triarylfosfátů- např. triortokresylfosfátu) se vyvíjí organofosfáty vyvolaná prolongovaná neuropatie (organophosphate-induced delayed polyneuropathy, OPID). V závislosti na závažnosti otrav se mohou vyvinout sensorické poruchy (mravenčení, bolesti), které se zpočátku objevují distálně v končetinách, pak stoupají a zesilují. Současně se vyvíjí motorické poruchy (až ochrnutí). Tyto poruchy spočívají v edémech a fragmentaci axonů a konečně v demyelinizaci periferních a centrálních axonů. Klinický obraz lze označit jako polyneuropatie.

Specifická léčba není známa. Ústup příznaků trvá měsíce i roky. Mohou zůstat trvalé následky (spasticita). Chronická expozice OF může zaznamenat poškození funkce svalů, vyvolané četnými degenerativními změnami jednotlivých svalových vláken.

Jako funkční antidotum při otravách inhibitory cholinesterázy typu organofosfátů se užívá atropin. Je to alkaloid získávaný z četných lilkovitých rostlin, zejména z *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger* a *Datura stramonium*. Specifickými antidoty jsou reaktivátory cholinesterázy: jako obidoxim a další doplňující symptomatická léčba, zejména pak podávání antikonvulziv.¹¹

Pro vyhodnocování nových oximů - jako antidot bojových nervově paralytických látek, se z etického původu užívají jen experimenty na zvířatech. Jakékoliv výsledky z experimentů na zvířatech a jejich klinická interpretace k lidem jsou ovšem komplikovány druhovou odlišností.¹²

Atropin



4.3.2 NEREAKTIVNÍ INHIBITORY

Jedná se o látky, které inhibují AChE na základě nevazebných interakcí, které nevedou k vytvoření kovalentní vazby mezi inhibitorem a serinovým hydroxylem v aktivním esteratickém centru enzymu. Inhibici mohou způsobit interakcí s α -anionickým místem nebo s allosterickými místy na β řetězci.

4.3.2.1 NEKVARTÉRNÍ INHIBITORY

Nejdůležitější terapeutický přínos inhibitorů cholinesterázy představuje jejich využití při léčbě Alzheimerovy choroby (Alzheimer's disease, AD). Je to neurodegenerativní onemocnění, které postihuje především stárnoucí populaci. Je charakterizováno ztrátou paměti. Samotná etiologie je neznámá. Přibližně 90 % případů je zprvu klasifikováno jako ojedinělé pozdní výpadky paměti, které se objevují u každého druhého člověka staršího 85 let. Histopatologický obraz zahrnuje tři hlavní patologické znaky: β - amyloidní klubka, neurofibrilární zámotky a úbytek synapsí. Deficit v cholinergním systému je považován za jednu z hlavních příčin poškození paměti u AD.¹³ Přibližně u 50 % pacientů s AD se stabilizují kognitivní funkce ve srovnání s placebem na dobu 12 měsíců. Poslední studie ukazují, že u určitého procenta (přibližně u 20 %) pacientů, může být kognitivně stabilizující efekt prodloužen až k 24 měsícům. Tyto klinické poznatky připouštějí i jiný mechanismus účinku než pouze cholinerní. V in vitro a in vivo studiích lze např. demonstrovat spojení mezi cholinerní aktivací a APP (amyloid precursor protein) metabolismem. Poškození centrálních cholinerních neuronů způsobuje rychlý nárůst APP v mozkové kůře a CSF (cerebrospinal fluid). Redukce v cholinerní neurotransmisi- typická právě pro AD - tak vede k nadměrné produkci amyloidního proteinu a přispívá k následné neuropatologické a kognitivní dysfunkci.

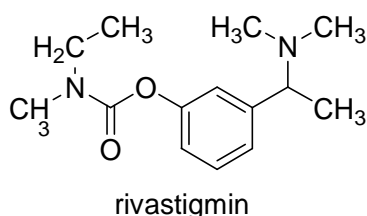
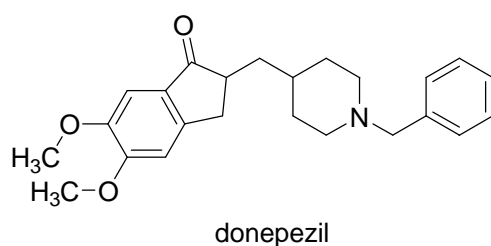
Mozek savců obsahuje dvě odlišné formy cholinesterázy: AChE a BuChE. BuChE není fyziologický substrát mozku savců. V lidském těle se nalézá v neuronech a gliových buňkách, stejně jako v krevních destičkách, u AD pacientů pak ve zvýšené míře v depozitech amyloidu. Zatímco se AChE aktivita u AD pacientů snižuje, BuChE aktivita naopak vykazuje vzestup.

Byla provedena měření a pokusy a ke studiu funkce BuChE se perfundoval intrakortikálně potkaní mozek a aplikoval se selektivní inhibitor BuChE. Bylo pozorováno, že extracelulární ACh se zvýší 15-krát z 5 nM koncentrace k 75 nM koncentraci s malým cholinerním vedlejším efektem u zvířat.

Základní poznatek z těchto a dalších klinických dat je ten, že existuje vztah mezi CSF s inhibovanou BuChE a kognitivní funkcí u AD pacientů.¹⁴

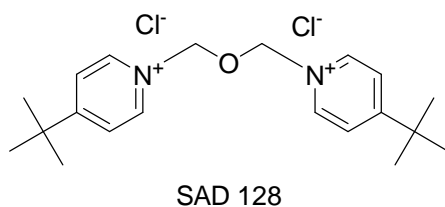
V zájmu léčení AD byly provedeny jak krátkodobější, tak dlouhodobější studie, kde byly společně testovány inhibitory donepezil, rivastigmin a galantamin. Tyto tři inhibitory prokázaly u AD nejen zlepšení kognitivních funkcí, ale také obecné zlepšení životních funkcí a celkového chování pacienta.

Chemické struktury inhibitorů používaných v terapii AD:



4.3.2.2 KVARTÉRNÍ INHIBITORY

Jedná se o látky, které se jako falešné substráty mohou krátkodobě a plně reverzibilně navázat na aktivní centrum esterasy, tím pak kompetitivně bránit navázání ACh na anionické místo a v konečném dopadu tak snížit esterasovou aktivitu. Působí především periferně (edrofonium se používá např. k diagnóze myastenia gravis).¹⁵ Další využití je jako profylaktikum při otravě jinými závažnějšími inhibitory AChE a to zejména NPL a pesticidy. Nejznámější látkou je SAD-128. I když se jedná o kvartérní látku, existují klinické důkazy mnoho o jejím případném využití pro léčbu AD.¹⁶



4.4 REAKTIVÁTORY CHOLINESTERÁZY

Reaktivátory cholinesterázy jsou nukleofilní činidla, která jsou schopna defosforylovat inhibovaný enzym a navrátit mu tak původní aktivitu. Reaktivací schopnost je vázána na existenci fosforylovaného enzymu v nedealkylované formě. Praktický význam mají jako antidota při otravách OF, neboť jsou schopny obnovit fyziologickou funkci fosforylovaného enzymu. Opakované podávání reaktivátorů AChE bývá zvláště u otrav NPL s rychlou dealkylací diskutabilní, na rozdíl od anticholinergik, jejichž opakované podávání až do příznaků atropinizace je velmi důležité.³

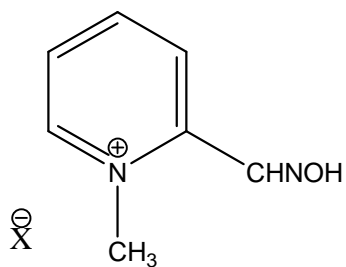
Myšlenka, že by určité sloučeniny mohly značně urychlit spontánní regeneraci fosforylované AChE, je spojena s Wilsonovým experimentem s hydroxylaminem a cholinem. Hydroxylamin totiž poukázal na nutnost nalézt sloučeniny se zlepšenými nukleofilními vlastnostmi, zatímco cholin podnítil myšlenku, že kvartérní dusík by mohl nukleofilní atak zesílit. Očekávaný terapeutický potenciál některých sloučenin tohoto typu tedy stimuloval hledání dalších látek, které vyvrcholilo objevem pralidoximu (2-PAM, 2-pyridiniumaldoxim-methyljodid). O tento objev se zasloužil Wilson, Ginsburg a kolektiv. V současné době jsou známy stovky sloučenin, které jsou nazývané reaktivátory fosforylované AChE.¹⁷

Reaktivátory se zpočátku vážou svým pozitivně nabitým dusíkem na anionické centrum esterázy. Tím se dostává aldoximový postranní řetězec do bezprostřední blízkosti fosforylovaného esterického centra. Následuje přesun fosfátu na molekulu reaktivátoru a uvolnění cholinesterázy.¹¹ Tento děj se nazývá reaktivace fosforylované AChE. Nárůst samotné AChE aktivity může být způsoben i syntézou enzymu de novo, tento děj je však velmi pomalý.

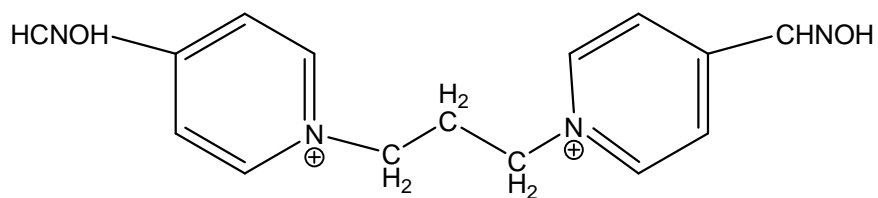
Neoficiálním standardem se stal 2-PAM, se kterým se porovnává naměřená účinnost jiných reaktivátorů. Nejvíce známé reaktivátory jsou aldoximy – derivátu pyridinu. Je mnoho bis-kvartérních dialdoximů (trimedoxim, obidoxim) a bis-kvartérní monoaldoximy (HI-6, HL-7).

Konkrétní vzorce reaktivátorů:

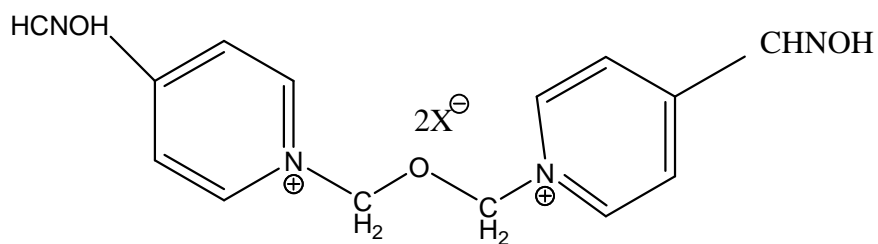
Pralidoxim



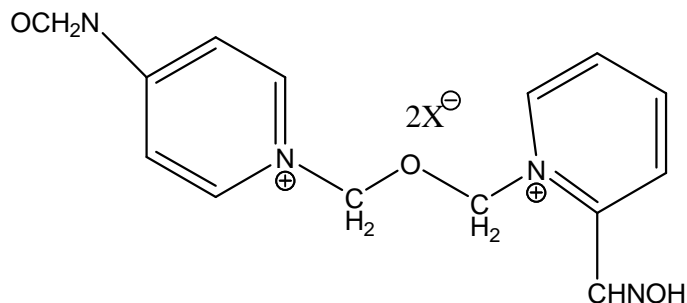
Trimedoxim



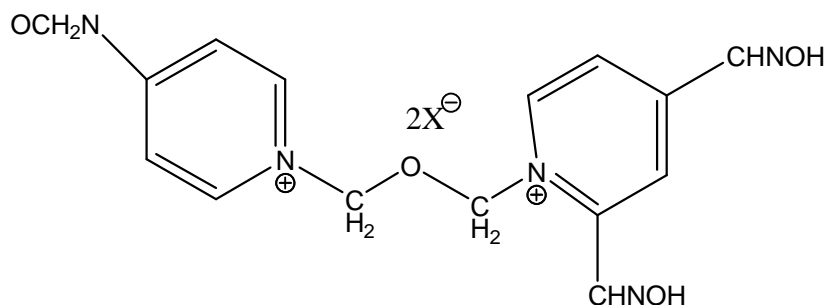
Obidoxim



HI-6



HL6-7



Obecně však platí, že reaktivční účinnost dialdoximů, jako je obidoxim, pralidoxim, je poměrně omezená, přičemž základní příčinou je rychlost stárnutí inhibovaného enzymu. Novější oxim HI-6 je zatím považován na základě experimentálních výsledků a klinických zkoušek za optimální lék volby v případě zasažení NPL.³

Kinetika reaktivace probíhá podle schématu :



Fosforylovaný enzym (EP) tvoří s reaktivátorem (R) přechodný komplex (EPR). Produkt této reakce je regenerovaný enzym (E) a fosforylovaný oxim (PR).

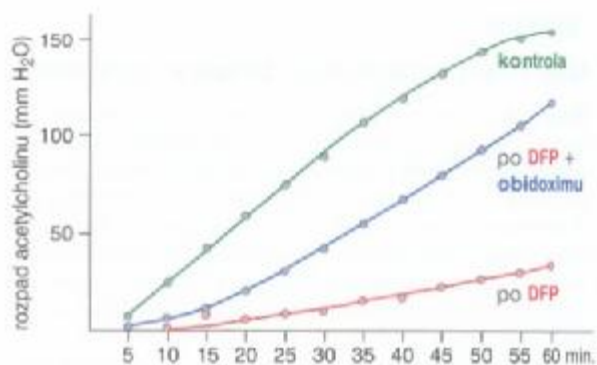
Samotné oximy mohou být silnými inhibitory cholinesterázy, ale jejich vazba je nestabilní a rozkládá se během několika minut až hodin.¹⁸

Následující schéma znázorňuje reaktivaci AChE obidoximem po otravě DFP (fluostigmin). Pokus měl uspořádání podle Warburga – tzn. izovolumetrické měření rozpadu ACh

Kontrola : štěpení Ach „pravou“ AChE („morčecí erytrocyty“)

Křivka DFP : inhibice aktivity enzymu přísadou diisopropylfluorofosfátu 30 minut před začátkem pokusu

Křivka DFP + obidoxim : reaktivace esterázy otrávené DFP přísadou obidoximu v čase 5 minut.



Zdroj: Lullmann, H., Mohr, K., Wehling, M., 2002. Farmakologie a toxikologie, Grada, ¹¹

4.5 CÍL PRÁCE

Cílem práce je změření aktivity acetylcholinesterázy po otravě organofosfáty, schopnosti aktivitu enzymu reaktivovat a daný inhibitor eliminovat s využitím in vivo metody. Zjištění síly běžně užívaných oximů (pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, oxim HI-6) k reaktivaci inhibované acetylcholinesterázy somanem či Ruskou VX látkou a k eliminaci somanu či Ruské VX látky. Procentuální vyjádření reaktivace inhibované AChE v potkaní krvi, mozku a bránici a určení nejúčinnějšího reaktivátoru pomocí Ellmanovy metody. Určení časové hranice pro účinnost antidot.

Oxim HI-6 je považován za nejvhodnější oxim pro antidotální léčbu akutních otrav RVX látkou, ale i pro léčbu otrav způsobené sarinem, cyklosarinem a somanem.

Aplikace modifikované kolorimetrické metody, Ellmanovy metody, pro stanovení aktivity AChE.

4.6 METODY STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERÁZ

Při stanovení aktivit cholinesteráz je možno využít mnoho principů. Obecně je nutno vycházet z toho, že do reakční směsi je dán enzym z různých zdrojů a vlastní reakce je zahájena přidáním substrátu. Po určité době, popř. kontinuálně, je sledován buď úbytek nerozloženého substrátu nebo přírůstek reakčních produktů, obojí buď přímo nebo nepřímo.

Byly popsány metody pro měření kinetiky enzymové hydrolýzy ACh a acetylthiocholinu v AChE in vivo, jako je metoda s využitím hydroxylaminu a HPLC metoda. Metoda používající hydroxylamin stanovuje závislost koncentrace substrátu vs. čas a HPLC metoda je schopná měřit současně závislost množství substrátu na času a zároveň oba primární produkty cholin nebo acetylthiocholin a kyseliny octovou.¹⁹

Pro testování enzymatické hydrolýzy ACh probíhající in vitro je užíván acetylthiocholin, protože mechanismus hydrolýzy acetylthiocholinu kvantitativně odpovídá mechanismu hydrolýzy ACh. Průběh reakce může být tedy kvantitativně měřen dvěma nezávislými metodami: spektrofotometricky – stanovení thiocholinu metodou podle Ellmana, a nebo elektrochemicky – stanovení kyseliny octové.

Všechny testované hydrolýzy odpovídají matematicky Michaelis-Mentenové rovnici s druhým ireverzibilním urychlením k úplnému vypotřebování substrátu. Rovnice popisuje chování mnoha enzymů při změně koncentrace substrátu. Byly provedeny korelace, tzn. diferenciální a integrální, kinetické rovnice popsané Michaelis – Mentenovým modelem. Optimální hodnoty Michaelisovy konstanty (K_M), maximální rychlost (V_m), kinetické konstanty jednotlivých reakčních kroků a absolutní koncentrace užívaných enzymů jsou vypočítány pro každý experiment.²⁰

Aktivita cholinesteráz je vyjadřována v různých jednotkách. Je však vhodné, aby byla vyjadřována v μmol rozštěpeného substrátu na časovou jednotku a 1 g materiálu (tkáň, ml krve atd). V současné době je aktivita vyjadřována v kataltech na litr. Jedná se o pojem „koncentrace katalytické aktivity“, s jednotkou katal na litr (kat/l), což odpovídá přeměně jednoho molu substrátu za sekundu na litr např. séra, plazmy.²

Pro přesnější diagnostiku je nejlepší měřit aktivitu obou enzymů (AChE i BuChE), což předpokládá u krve její centrifugaci a tím i časové ztráty. Je-li měřena aktivita cholinesteráz v celé krvi, výsledky nejsou zcela přesné, protože jde o společný účinek obou enzymů, jak AChE, tak BuChE (přibližně 80% : 20%). Přesto je však tento způsob výhodný, protože umožňuje zpracování materiálu bez předchozí centrifugace a krevní AChE je nejdůležitějším diagnostickým ukazatelem otravy.

Nejrozšířenější jsou modifikace těchto metod:

- § potenciometrické – měřena změna potenciálu způsobená H^+ ionty kyseliny, uvolňované při hydrolýze substrátu ve slabě pufovaném prostředí. Acetát snižuje pH. Tento pokles se eliminuje hydroxidem, dokud nedojde k ustálené hodnotě pH. Výsledkem měření je spotřeba hydroxidu.
- § titrační – využití neutralizace při hydrolýze vznikající kyseliny louhem při zachování konstantního pH
- § manometrické – měření objemu CO_2 uvolněného z bikarbonátu kyselinou vznikající při hydrolýze substrátu
- § radiometrické – využití značkovaných substrátů
- § polarografické
- § fluorimetrické
- § kolorimetrické – určují změnu zbarvení indikátoru při změně pH nebo rozštěpený substrát, popř. štěpené produkty reakce v čase

Nejužívanější je metoda potenciometrická a kolorimetrická. U kolorimetrické metody je však nevýhodou zpracování biologického materiálu, který může způsobit, že homogenát není čirý a tím při měření způsobí zkreslení výsledků (např. měření aktivity u bránic)

Z hlediska dávek reaktivátorů se při experimentech užívají dávky ekvimolární či dávky ekvitoxické. Ekvimolární dávky se používají pokud je látka málo toxická, není schopná se rozpustit a při experimentu tedy není možné stanovit její toxicitu. Problémem však je vlastní toxicita reaktivátoru. Řádově se jedná o dávky 50-100 $\mu\text{mol/l}$. Konkrétně u oximů 1. generace jsou dávky kolem 200 mg/kg. HI-6 je již méně toxická a její dávka je 800 mg/kg.

Podávání ekvitoxických dávek je v porovnání s dávkami ekvimolárními lepší. Užívá se 2 % LD_{50} , což je množství reaktivátoru, které by se podalo člověku z hlediska toxicity.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 MATERIÁL

5.1.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

- § potkaní mozky
- § potkaní bránice
- § potkaní krev

zdroj: potkani Wistar o váze 200 – 350 g pocházeli z Konárovic.

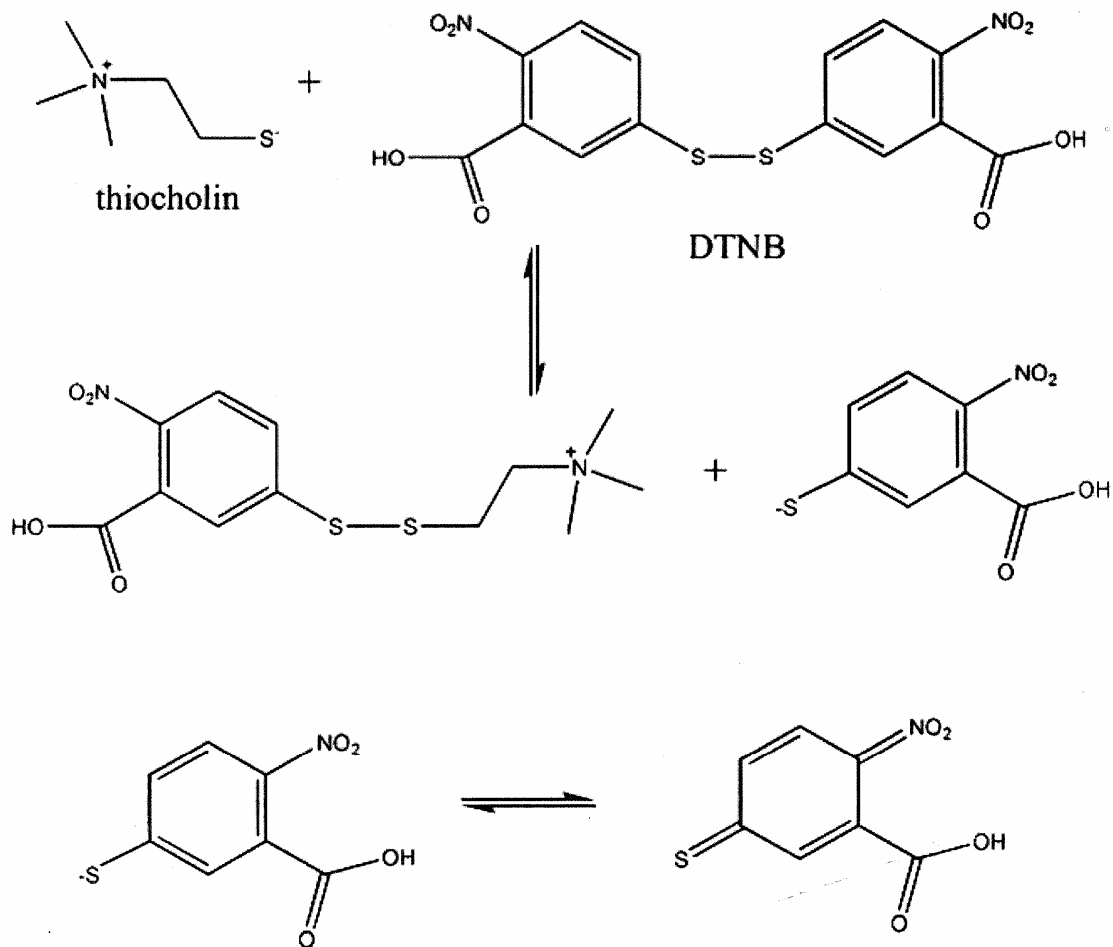
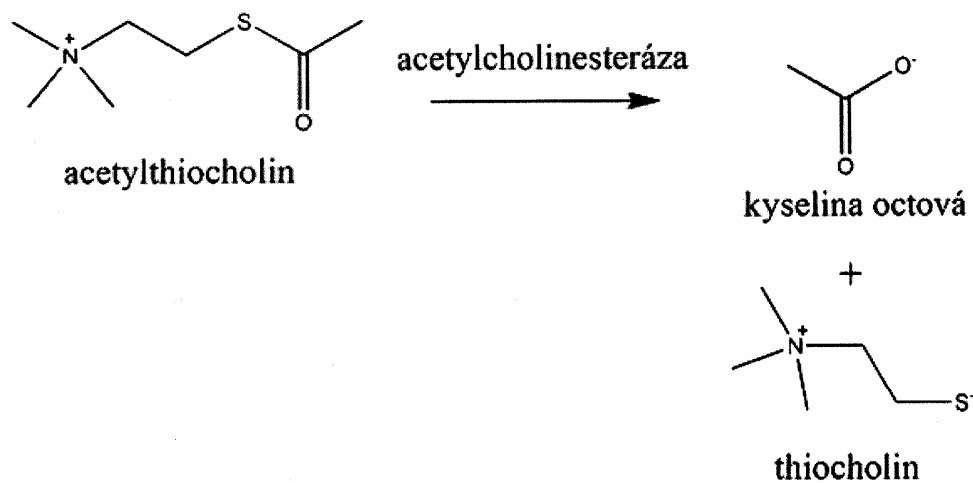
5.1.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- | | |
|--------------------------|--|
| § Acetylthiocholin-jodid | Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, ČR |
| § DTNB | Sigma-Aldrich, Praha, ČR |
| § RVX | Vojenský technický institut, Brno |
| § Soman | Katedra toxikologie, Fakulta vojenského
zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové, ČR |
| § Atropin | KTOX, FVZ UO, HK, ČR |
| § HI-6 | KTOX, FVZ UO, HK, ČR |
| § Pralidoxim | KTOX, FVZ UO, HK, ČR |
| § Obidoxim | KTOX, FVZ UO, HK, ČR |
| § Lidská krev | KTOX, FVZ UO, HK, ČR |
| § Destilovaná voda | KTOX, FVZ UO, HK, ČR |
| § Cystein | KTOX, FVZ UO, HK, ČR |

5.2 METODIKA

5.2.1 ELLMANOVA METODA

Pro konkrétní experiment byla použita Ellmanova metoda. Je to jedna z nejcitlivějších a nejpoužívanějších metod pro stanovení aktivity AChE a BuChE využívající štěpení thiocholinových esterů s následnou detekcí SH- skupin. Jedná se o modifikaci kolorimetrické metody za použití 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB, Ellmanovo činidlo). Cholinesterázy štěpí estery thiocholinu na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB a jeho zbytek 5-merkpto-2-nitrobenzoová kyselina, který je fotometrován. Výhodou této metody je specifika reakce, jednoduchost provedení a vysoká citlivost. Optimální podmínky při stanovení jsou pH 7,6, teplota 25°C a iontová síla, která by měla odpovídat iontové síle fyziologického roztoku. Aktivita cholinesteráz se zvyšuje s rostoucí koncentrací substrátu a při určité hodnotě koncentrace, „maximum koncentrace“, nastává inhibice substrátu.



Měření probíhalo při vlnové délce 412 nm. Pro kalibraci se místo hemolyzátu do kyvety pipetuje roztok různých koncentrací cysteinu. Fotometruje se proti slepému vzorku, který je zpracován stejně, jen místo cysteinu je přidána destilovaná voda. Přítomnost inhibitoru se projevila žlutým zbarvením. Čím je koncentrace inhibitoru větší, tím menší je intenzita žlutého zbarvení.

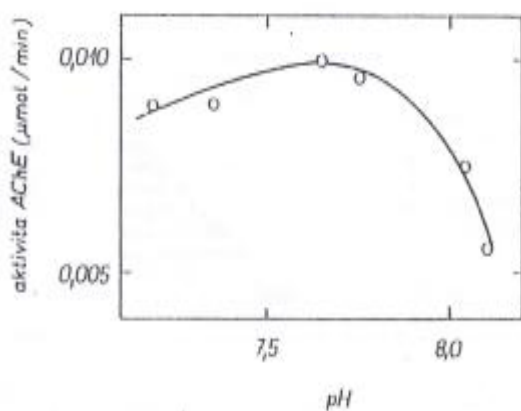
Bylo zjištěno, že aktivita cholinesteráz se zvyšuje s rostoucí koncentrací substrátu a při určité hodnotě koncentrace, „maximum koncentrace“, nastává inhibice substrátu. Proto byla vybrána pro měření aktivity AChE výsledná koncentrace 1×10^{-3} M. Aktivita AChE se zvyšuje také s nárůstem množství krve v reakční směsi. Závislost je do 3 μ l lineární, pak je intenzita zbarvení reakční směsi příliš vysoká, a měření není možné.

Modifikace byla v poměrném množství i složení použitých látek. Byl použit 0,2 M TRIS – HCl pufr: 24,2 g 1,1,1,-tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Lachema Brno) byl rozpuštěn v 1000,0 ml destilované vody. 50,0 ml tohoto roztoku bylo smícháno s 38,4 ml 0,2 M HCl, a doplněno destilovanou vodou na 200,0 ml a pH bylo upraveno na 7,6. Činidlo na SH-skupiny – DTNB - 0,1 g DTNB bylo rozpuštěno v 50,0 ml 0,2 M TRIS pufru. Jako substrát byl použit 0,029 g acetylthiocholin-jodid, který byl rozpuštěn v 10,0 ml destilované vody.

Samotný vzorek pro měření byl připraven následovně: mikropipetou bylo odebráno 5 μ l a hemolyzovaly se přidáním 0,4 ml destilované vody. Vznikl tak hemolyzát, který byl připravený pro stanovení vlastní aktivity.

Optimální podmínky pro stanovení byly: pH 7,6, teplota 25°C a iontová síla. Hodnota pH, kdy je dosaženo optimum pro enzymatické štěpení acetylthiocholinu je v rozmezí 7,6-7,8. Se zvyšujícím se pH však roste i neenzymatická hydrolýza acetylthiocholinu (viz.obrázek níže). Proto hodnota pH 7,6 je optimální hodnotou, kdy je zanedbatelná hydrolýza substrátu.²¹

Obr. 5: závislost aktivity AChE na pH



zdroj: Bajgar, J., Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi, Vojenské zdravotnické listy, roční XLI. č.2²¹

5.2.2 HOMOGENIZACE

Homogenizace krve

Byly použity zmrazené vzorky. Homogenizovaly se ručním homogenizátorem Ultra – Turrax přibližně 1 minutu. Z homogenátu krve bylo pipetou odebráno 100 µl do zkumavky, do které bylo přidáno ještě 1,90 ml destilované vody. Takto připravený hemolyzát byl promíchán a inkubován 4 minuty. Hemolyzát tedy obsahoval i malé množství BuChE (přibližně 20 %).

Homogenizace bránice

Byly použity zmrazené či nativní bránice, které se zvažily. Jejich váha se pohybovala kolem 500 mg. K bránici byla přidána destilovaná voda a to v množství, jež odpovídalo desetinásobku její váhy. Následovala homogenizace ručním homogenizátorem Ultra – Turrax přibližně dvě minuty ve větší zkumavce. Homogenní vzorky byly buď připraveny do zkumavek na měření, či byly zmrazeny. Při pipetování do zkumavek musela být upravena špička pipety - odstřížení 5 mm, aby bylo možné suspenzi dávkovat pipetou.

Homogenizace mozku

Homogenizace mozku probíhala již popsaným postupem jako homogenizace bránice.

5.3 PODMÍNKY EXPERIMENTU PRO RVX

Pokusná zvířata byla potkani druhu Wistar mužského pohlaví. Potkani z nichž se získaly mozky, vážili 290 – 360 g a potkani, ze kterých se prováděl experiment s bránicemi a krví, vážili 200 – 350 g. Byli chováni v klimatizované místnosti se světlem od 7. – 19.hod. se standardní stravou.

5.4 PODMÍNKY EXPERIMENTU PRO SOMAN

Pokusná zvířata byla potkani druhu Wistar, mužského pohlaví, jejichž váha se pohybovala mezi 250 – 320 g. Byli udržováni v klimatizované místnosti se světlem od 7. – 19.hod. se standardní stravou

5.5 IN VIVO EXPERIMENT

Před začátkem hodnocení reaktivace a terapeutické účinnosti oximů byli potkani rozděleni do jednotlivých skupin o minimálním počtu pěti jedinců. Jednotlivým skupinám byl i.m. aplikován buď fyziologický roztok, jako roztok kontrolní, či samotný atropin nebo atropin v kombinaci s jedním studovaným oximem v ekvivalentní dávce. Atropin byl podán v dávce 21 mg/kg. Bylo zvoleno vyšší dávkování, protože potkani jsou vůči atropinu méně citliví než lidé, proto se dává ve větším množství. V určitém časovém odstupu proběhla intoxikace somanem nebo RVX. Za 30 minut po intoxikaci byli potkani dekapitováni a odebrána krev, mozky a bránice. Následovala homogenizace a určení AChE aktivity spektrofotometricky (Ellman). Měření probíhalo na spektrofometru HP 845 X při vlnové délce 436 nm. Standardně je užívána vlnová délka 412 nm, která je však v blízkosti absorpčního maxima hemoglobinu, z tohoto důvodu byla zvolena vlnová délka 436 nm.

Kalibrace přístroje

Pro kalibraci metody byl použit roztok cysteinu CYS - 43. Místo homogenátu byla užita destilovaná voda.

Slepý vzorek : 100 μ l destilované vody + 1,75 ml TRIS + DTNB + 200 μ l destilované vody.

Vzorky byly připraveny z roztoku cysteinu tak, aby výsledná koncentrace cysteinu byla 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 μ mol.

0,1ml cysteinu – odebráno 205 μ l a 205 μ l destilované vody

0,05 ml cysteinu - odebráno 205 μ l a 205 μ l destilované vody

0,025ml cysteinu - odebráno 205 μ l a 205 μ l destilované vody

5.5.1 RUSKÁ VX LÁTKA

5.5.1.1 EXPERIMENT I. – SLEDOVÁNÍ FARMAKOKINETIKY RVX

Cílem experimentu bylo sledování farmakokinetiky RVX látky v určitém čase po otravě na základě stupně inhibice obsažených cholinesteráz. Experiment může také poskytnout informace, v jakém čase má ještě smysl podávat antidota.

Potkani byli rozděleni do 7 skupin, z nichž poslední skupina byla skupina kontrolní. Každá skupina byla zastoupena devíti zvířaty a ve skupině kontrolní bylo zvířat pět (poslední skupina v Tab.I.). Všechny skupiny jsou intoxikovány 1 LD₅₀ (14 µg/kg).

Odběry mozkové tkáně byly v časových intervalech: 3, 6, 10, 20, 40 a 60 min a byly porovnány se skupinou kontrolní. Všechny odebrané vzorky byly před vlastním stanovením 10x zředěny.

Naměřené hodnoty byly zaznamenány do Tab.I. podle časové posloupnosti odběrů, byla zaznamenána naměřená aktivita v µkat/kg a u každé skupiny byla také spočítána průměrná aktivita. Hodnoty označené šedivou barvou byly kvůli chybě vyřazeny ze skupiny.

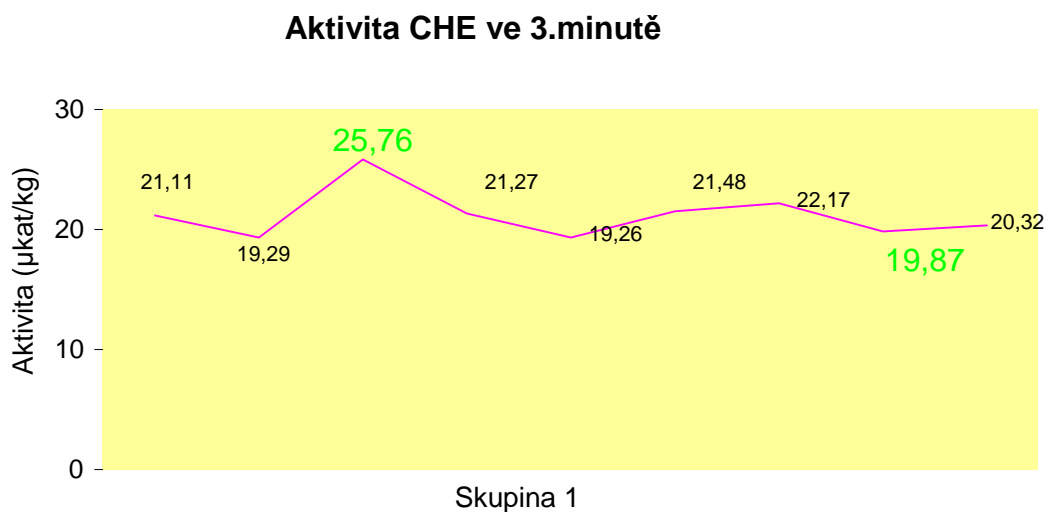
Tab.I.: naměřená aktivita AChE jednotlivých vzorků v dané časové posloupnosti, hodnoty označené červenou barvou jsou průměrné hodnoty aktivit celé skupiny

Skupina, Vzorek	AKTIVITA $\mu\text{kat/kg}$		AKTIVITA $\mu\text{kat/kg}$	Poznámka		
1,1	21,11	Průměr Std. D.	21,17 1,99	Odběr za 3 min		
1,2	19,29					
1,3	25,76					
1,4	21,27					
1,5	19,26					
1,6	21,48					
1,7	22,17					
1,8	19,87					
1,9	20,32					
2,1	26,10	Průměr Std. D.	20,05 4,52	Odběr za 6 min		
2,2	14,15					
2,3	14,63					
2,4	23,48					
2,5	17,20					
2,6	23,80					
2,7	22,49					
2,8	18,52					
2,9	38,34				vyřazená hodnota ze skupiny	
3,1	8,93	Průměr Std. D.	10,07 1,94	Odběr za 10 min		
3,2	10,04					
3,3	6,34					
3,4	8,16					
3,5	11,24					
3,6	11,67					
3,7	11,63					
3,8	12,24					
3,9	10,38					
4,1	4,02	Průměr Std. D.	7,03 2,77	Odběr za 20 min		
4,2	5,17					
4,3	5,10					
4,4	8,11					
4,5	10,78					
4,6	8,92					
4,7	11,14					
4,8	5,79					
4,9	4,25					
5,1	14,77	Průměr Std. D.	19,28 3,86	Odběr za 40 min		
5,2	16,56					
5,3	16,01					
5,4	35,89				vyřazená hodnota ze skupiny	
5,5	26,63					
5,6	21,98					
5,7	20,30					
5,8	20,27					
5,9	17,69					
6,1	9,71	Průměr Std. D.	9,774 1,551	Odběr za 60 min		
6,2	9,53					
6,3	8,15					
6,4	8,86					
6,5	7,96					
6,6	10,48					
6,7	9,09					
6,8	11,51					
6,9	12,68					
7,1	21,02	Průměr Std. D.	26,84 7,471	Kontrola		
7,2	20,85					
7,3	23,74					
7,4	38,35					
7,5	30,22					

Grafické zpracování výsledků :

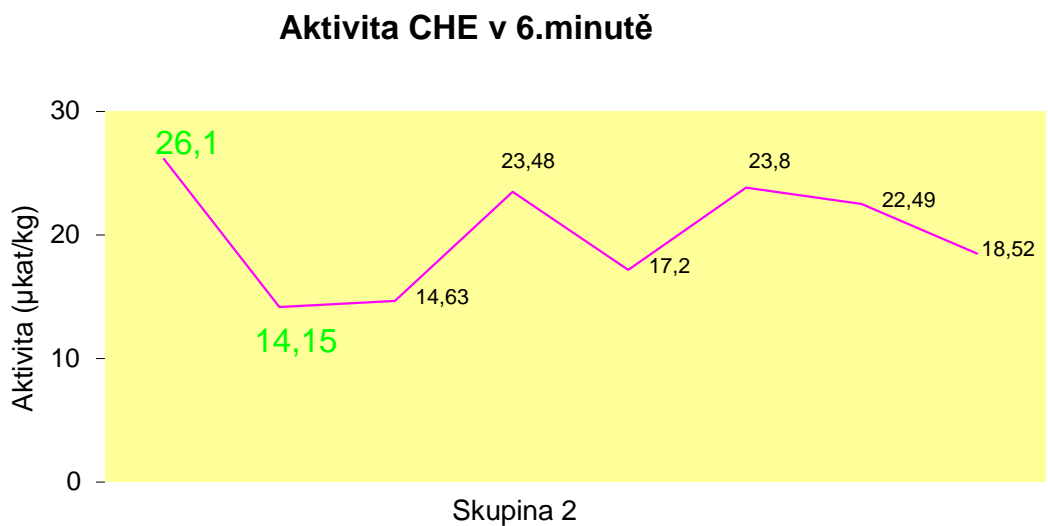
Graf č.1 - znázorňuje závislost aktivity cholinesterázy ve 3.minutě.

Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené ve 3.minutě.



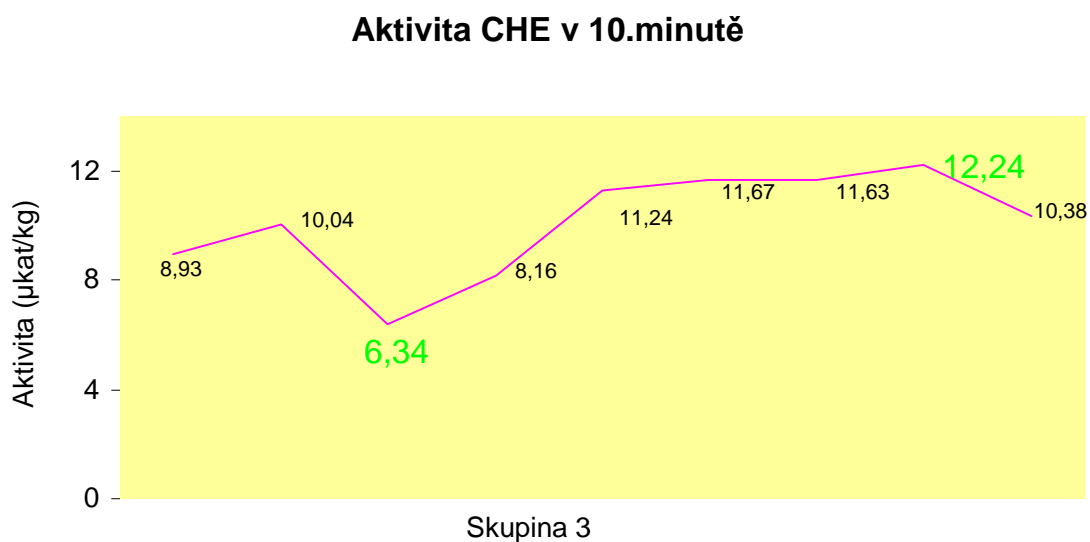
Graf č.2 - znázorňuje závislost aktivity cholinesterázy v 6.minutě

Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené v 6.minutě



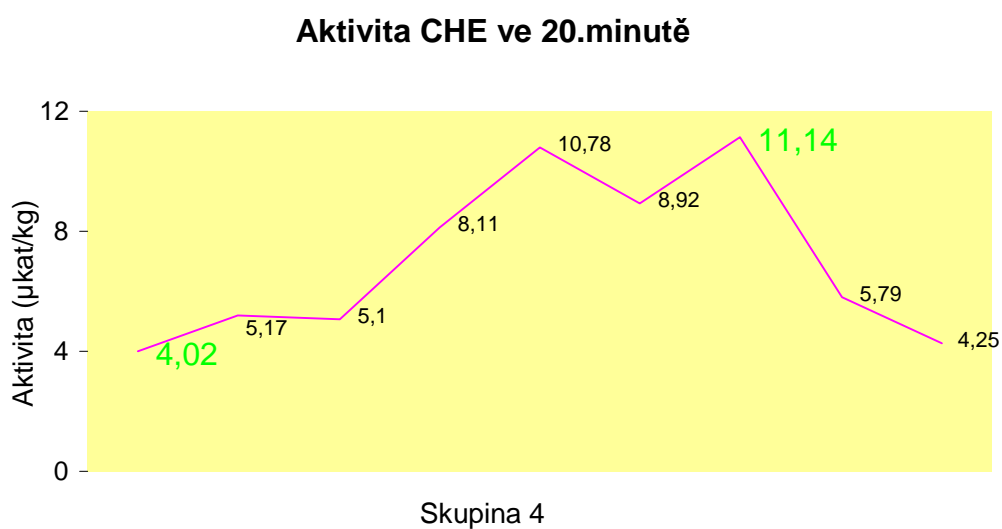
Graf č.3 - znázorňuje aktivitu cholinesterázy v 10.minutě.

Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené v 10 minutě



Graf č.4 - znázorňuje aktivitu cholinesterázy ve 20.minutě.

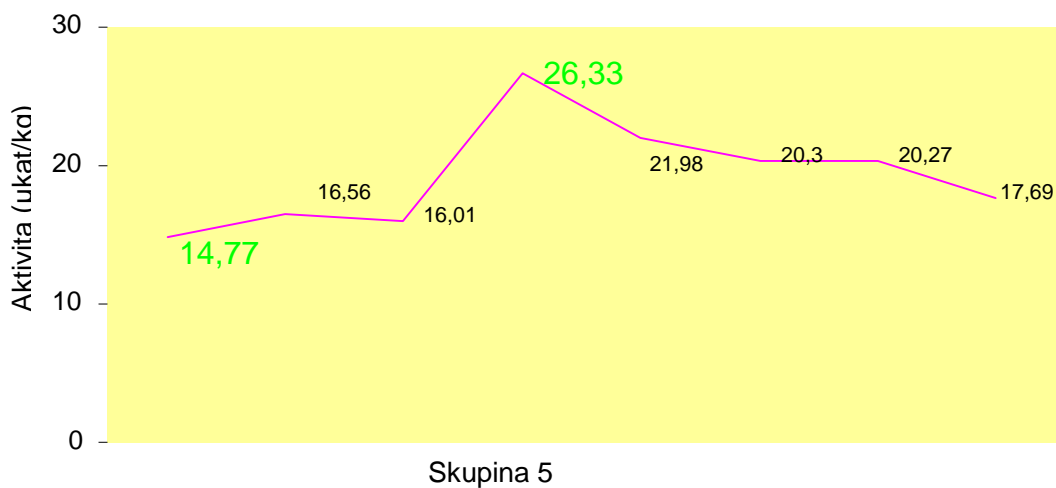
Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené ve 20.minutě.



Graf č.5 - znázorňuje aktivitu cholinesterázy ve 40.minutě.

Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené ve 40.minutě.

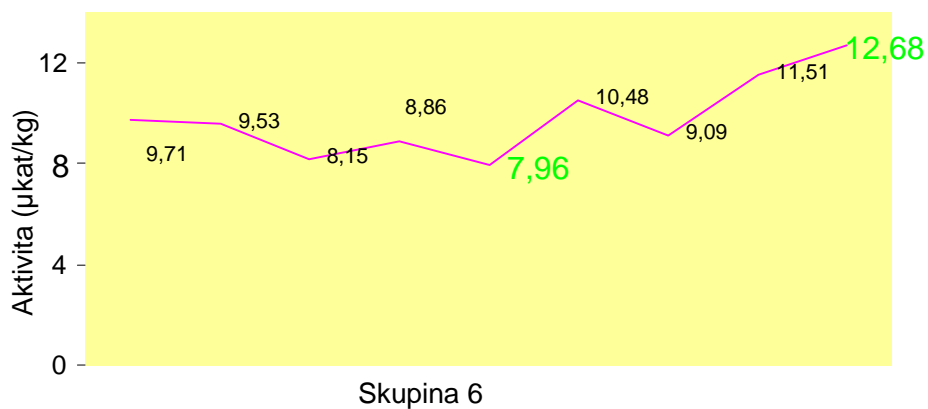
Aktivita CHE ve 40.minutě



Graf č.6 - znázorňuje aktivitu cholinesterázy v 60.minutě

Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené v 60.minutě.

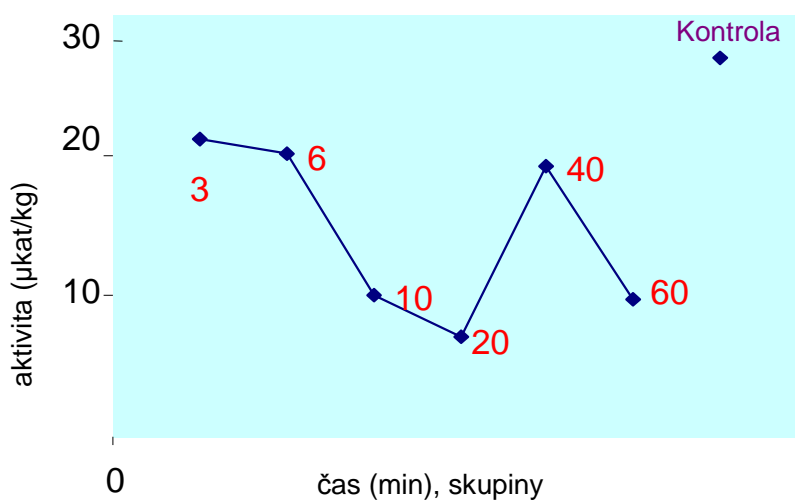
Aktivita CHE v 60.minutě



Tabulka II.- souhrnná tabulka s průměrnými aktivitami CHE při jednotlivých časových intervalech

čas (min)	průměrná aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)
3	21,200
6	20,050
10	10,070
20	7,031
40	19,280
60	9,774
Kontrola	26,840

Graf č.7 - vyjadřuje závislost průměrných hodnot aktivit CHE na časech



Při vyjádření aktivity CHE v procentech v Tab.III., považujeme hodnotu kontrol za 100%.

Číslo skupiny	Průměrná aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)	%
1	21,17	78,87
2	20,05	74,7
3	10,07	37,52
4	7,03	26,2
5	19,30	71,83
6	9,77	36,42

5.5.1.2 EXPERIMENT II. – SROVNÁVÁNÍ ÚČINNOSTI TERAPEUTICKÝCH KOMBINACÍ PRO LÉČBU OTRAV RVX

Experiment poskytuje srovnávací informace o účinnosti několika terapeutických kombinací pro léčbu otrav RVX látkou po intoxikaci potkana dávkou ekvivalentní 1 LD₅₀.

Potkani jsou rozděleni do 5 skupin po osmi zvířatech. Jedna z pěti skupin, je skupina kontrolní, které byl podán fyziologický roztok.

Jednotlivým skupinám potkanů byly i.m. aplikovány studované oximy v kombinaci s atropinem či atropin samotný v ekviefektivní dávce, která odpovídá humánní dávce (2 % LD₅₀).

Po jedné minutě byl každému potkanovi i.m. aplikován do pravé zadní končetiny 1 LD₅₀ RVX, jejíž dávkování bylo upraveno podle jednotlivých hmotností potkanů.

Obecně 1 LD₅₀ RVX= 10,0 µg/kg

Po 30 minutách byli potkani dekapitováni a odebrány mozky, bránice a krev.

Tab.IV.:uvádí aplikované látky jednotlivým skupinám po intoxikaci RVX.

Skupina	Aplikované látky
1.	fyziologický roztok
2.	ATR 21 mg/kg
3.	ATR 21 mg/kg + 2-PAM 5,2 mg/kg
4.	ATR 21 mg/kg + TO 048 3,8 mg/kg
5.	ATR 21 mg/kg + HI- 6 13,8 mg/kg

Tab V.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity CHE v $\mu\text{kat/l}$ v krvi po intoxikaci RVX.

Všechny vzorky byly desetinásobně zředěny a kalibrovány.

vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8
aktivita ($\mu\text{kat/l}$)	18,0	17,2	19,3	19,5	17,3	19,0	13,9	20,1

vzorek	9	10	11	12	13	14	15	16
aktivita ($\mu\text{kat/l}$)	13,0	12,3	10,3	11,6	13,1	12,4	13,7	12,0

vzorek	17	18	19	20	21	22	23	24
aktivita ($\mu\text{kat/l}$)	15,0	16,9	15,5	16,5	17,2	16,4	9,5	16,4

vzorek	25	26	27	28	29	30	31	32
aktivita ($\mu\text{kat/l}$)	17,0	18,8	14,3	16,0	17,8	16,2	16,8	16,7

vzorek	33	34	35	36	37	38	39	40
aktivita ($\mu\text{kat/l}$)	16,0	17,9	21,0	15,4	20,7	20,1	18,0	18,4

Tab.VI.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity CHE v $\mu\text{kat/kg}$ u vzorků bránic po intoxikaci RVX. Všechny vzorky byly desetinásobně zředěny a kalibrovány.

vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8
aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)	65,0	45,5	45,7	45,2	42,5	58,5	60,3	47,6

vzorek	9	10	11	12	13	14	15	16
aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)	49,3	50,1	56,7	45,0	48,9	50,5	51,3	49

vzorek	17	18	19	20	21	22	23	24
aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)	23,0	38,4	14,7	47,3	17,2	13,5	10,2	11,8

vzorek	25	26	27	28	29	30	31	32
aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)	9,6	10,8	13,9	7,7	7,5	19,2	14,5	17,6

vzorek	33	34	35	36	37	38	39	40
aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)	18,7	61,5	244	61,9	60,6	67,9	86,0	49,8

Tab.VII.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity CHE v $\mu\text{kat/kg}$ v mozcích potkanů po intoxikaci RVX. Všechny vzorky byly desetinásobně zředěny a kalibrovány.

vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8
aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)	80,7	72,3	72,5	65,6	67,6	59,4	58,1	62,6

vzorek	9	10	11	12	13	14	15	16
aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)	71,6	55,1	55	54,7	61,6	62,2	71,1	61,4

vzorek	17	18	19	20	21	22	23	24
aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)	51,9	69,2	69,3	69,1	69,1	72,3	65,2	68,9

vzorek	25	26	27	28	29	30	31	32
aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)	57,9	57,2	54,4	59	60,5	55	62,2	50,4

vzorek	33	34	35	36	37	38	39	40
aktivita ($\mu\text{kat/kg}$)	61,1	51,5	61	63,7	62,7	58,9	64,9	74,1

Aktivita v $\mu\text{kat}/\text{kg}$ a $\mu\text{kat}/\text{l}$ jednotlivých terapeuticky účinných látek ve vzorcích krve, bránice a mozcích je zaznamenána v následující tabulce VIII., kde hodnoty zvýrazněné červeně ukazují, že v mozku došlo k nejvyššímu stupni reaktivace.

Vzorky	kontrola	ATR	ATR + 2PAM	ATR + T0 048	ATR + HI-6
Krev	18,038	12,338	15,4125	16,700	18,4625
Mozek	67,350	61,588	66,8750	57,075	62,2375
Bránice	51,288	50,010	22,0125	12,600	81,2250

5.5.2 SOMAN

Potkani byli rozděleni do 6 skupin po šesti potkanech, z nichž jedna skupina byla kontrolní.

Jednotlivým skupinám potkanů (skupina 1 – 5) byl i.m. aplikován atropin v dávce 21 mg/kg a po pěti minutách byl aplikován do pravé zadní končetiny studovaný oxim v ekvivalentní dávce.

Kontrolní skupině K byl podán fyziologický roztok.

Fyziologický roztok i soman byly v dávce odpovídající 1 LD₅₀.

Obecně : 1 LD₅₀ somanu = 120 µg/kg

Tab. IX-jednotlivým skupinám potkanů byla podána dávka různého oximu

skupina	Terapie	Intoxikace
K	ATR 21 mg/kg	+ po 5 min. fyziol.roztok
1.	ATR 21 mg/kg	+ po 5 min 1 LD ₅₀ somanu
2.	ATR 21 mg/kg + 18,9 mg/kg HI-6 chlorid	+ po 5 min 1 LD ₅₀ somanu
3.	ATR 21 mg/kg + 24,8 mg/kg HI-6 mesylát	+ po 5 min 1 LD ₅₀ somanu
4.	ATR 21 mg/kg + 23 mg/kg K 074	+ po 5 min 1 LD ₅₀ somanu
5.	ATR21 mg/kg + 22,9 mg/kg K 075	+ po 5 min 1 LD ₅₀ somanu

Po 30 minutách byli potkani dekapitováni a odebrány vzorky mozků, bránic a krve.

Tab.X.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity CHE v $\mu\text{kat/l}$ ve vzorcích potkaní krve po intoxikaci somanem.

skupina, vzorek	AKTIVITA $\mu\text{kat/l}$		AKTIVITA $\mu\text{kat/l}$
1,1	4,042	Průměr	4,617
1,2	4,555	Std. D.	0,318
1,3	4,920		
1,4	4,650		
1,5	4,890		
1,6	4,641		
2,1	5,517	Průměr	5,318
2,2	5,950	Std. D.	0,685
2,3	5,652		
2,4	4,927		
2,5	5,747		
2,6	4,112		
3,1	4,430	Průměr	4,783
3,2	4,120	Std. D.	0,546
3,3	4,881		
3,4	5,666		
3,5	4,738		
3,6	4,916		
4,1	4,467	Průměr	4,433
4,2	4,719	Std. D.	0,281
4,3	4,342		
4,4	4,847		
4,5	4,225		
4,6	4,095		
5,1	4,616	Průměr	4,1
5,2	4,237	Std. D.	0,442
5,3	4,248		
5,4	4,321		
5,5	3,786		
5,6	3,382		
6,1	4,630	Průměr	4,403
6,2	4,486	Std. D.	0,341
6,3	3,777		
6,4	4,260		
6,5	4,698		
6,6	4,561		
7,1	10,089	Průměr	11,18
7,2	11,310	Std. D.	1,234
7,3	11,261		
7,4	13,320		
7,5	11,244		
7,6	9,830		

Tab.XI.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity CHE v $\mu\text{kat/kg}$ v mozcích potkanů po intoxikaci somanem. Naměřené hodnoty označené šedou barvou byly ze skupin vyřazeny.

skupina, vzorek	AKTIVITA $\mu\text{kat/kg}$		AKTIVITA $\mu\text{kat/kg}$
1,1	3,331	Průměr	4,827
1,2	4,271		
1,3	3,828	Std.D	1,449
1,4	6,044		
1,5	11,411	vyřazená hodnota ze skupiny	
1,6	6,663		
2,1	21,404	Průměr	12,690
2,2	25,695		
2,3	17,732	Std.D	10,130
2,4	5,078		
2,5	2,300		
2,6	3,940		
3,1	3,012	Průměr	3,324
3,2	2,467		
3,3	3,129	Std.D.	0,959
3,4	4,262		
3,5	4,712		
3,6	2,361		
4,1	2,876	Průměr	2,944
4,2	6,320		
4,3	2,631	Std.D.	1,709
4,4	1,687		
4,5	2,106		
4,6	2,041		
5,1	2,187	Průměr	2,662
5,2	11,454		
5,3	2,464	Std.D.	0,943
5,4	1,491		
5,5	3,259		
5,6	3,912		
6,1	2,266	Průměr	3,778
6,2	3,854		
6,3	13,636	Std.D	0,9671
6,4	4,910		
6,5	3,680	vyřazená hodnota ze skupiny	
6,6	4,177		
7,1	50,073	Průměr	44,190
7,2	36,192		
7,3	47,203	Std. D.	4,965
7,4	42,794		
7,5	47,052		
7,6	41,853		

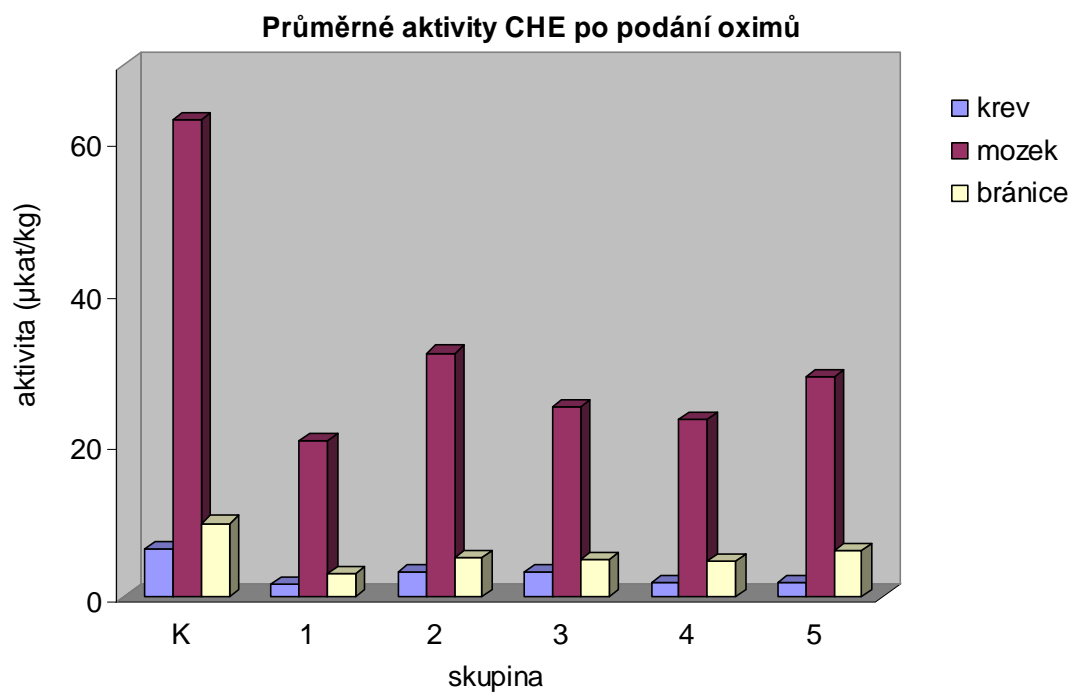
Tab.XII.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity CHE v $\mu\text{kat}/\text{kg}$ ve vzorcích bráníc po intoxikaci somanem. Naměřené hodnoty označené šedou barvou jsou ze skupin vyřazeny.

skupina, vzorek	AKTIVITA $\mu\text{kat}/\text{kg}$		AKTIVITA $\mu\text{kat}/\text{kg}$
1,1	0,166	Průměr	0,7977
1,2	0,682	Std. D.	0,5131
1,3	0,632		
1,4	1,567		
1,5	4,649	vyřazená hodnota ze skupiny	
1,6	0,942		
2,1	15,416	Průměr	6,087
2,2	11,414	Std. D.	6,727
2,3	8,949		
2,4	0,742		
2,5	0		
2,6	0		
3,1	6,061	Průměr	3,55
3,2	2,891	Std. D.	3,024
3,3	0		
3,4	6,122		
3,5	6,226		
3,6	0		
4,1	4,180	Průměr	1,295
4,2	2,147	Std. D.	1,618
4,3	0,852		
4,4	0,591		
4,5	0		
4,6	0		
5,1	5,687	Průměr	2,849
5,2	4,683	Std. D.	2,278
5,3	3,913		
5,4	0		
5,5	0,659		
5,6	2,155		
6,1	2,060	Průměr	4,457
6,2	5,841	Std. D.	2,195
6,3	6,743		
6,4	5,080		
6,5	5,633		
6,6	1,386		
7,1	18,192	Průměr	16,94
7,2	15,707	Std.D.	1,224
7,3	15,375		
7,4	16,586		
7,5	17,824		
7,6	17,961		

Výsledná aktivita jednotlivých skupin v odebraných vzorcích po intoxikaci somanem je zaznamenána v níže uvedené tabulce XIII., kde hodnoty označené červeně vyznačují nejvyšší stupeň reaktivace u vzorků krve, mozků a bránice

skupina	$\mu\text{kat/l}$ _{krev}	$\mu\text{kat/kg}$ _{mozek}	$\mu\text{kat/kg}$ _{bránice}
K	6,240	62,690	9,655
1	1,695	20,580	3,012
2	3,320	32,080	5,172
3	3,192	25,060	4,973
4	1,827	23,240	4,560
5	1,848	29,020	6,117

Graf č. 8 - znázornění průměrné aktivity cholinesteráz po podání oximů



6 VÝSLEDKY

6.1 RVX

6.1.1 VÝSLEDKY EXPERIMENTU I.

Cílem pokusu bylo zjistit stupeň inhibice cholinesterázy po podání jednonásobku LD₅₀. Z naměřených výsledků je patrné, že kontrolní roztok měl nejvyšší aktivitu cholinesterázy a s postupujícím časem se aktivita cholinesterázy postupně snižovala. V 10. minutě došlo k výraznému poklesu aktivity cholinesterázy. Ve 20. minutě odběru vzorku výrazný pokles aktivity pokračoval, ovšem ve 40. minutě následoval vzestup a v 60. minutě byla aktivita cholinesterázy v porovnání s 20. minutou vyšší.

6.1.2 VÝSLEDKY EXPERIMENTU II.

Cílem pokusu II. bylo srovnání účinnosti několika terapeutických kombinací pro léčbu intoxikace RVX látkou dávkou ekvivalentní jednonásobku LD₅₀, která představovala 10,0 µg/kg.

Naměřené výsledky znázorňují, že terapeutická kombinace ATR + HI-6 ve vzorcích krve a bránic měla vyšší aktivitu cholinesteráz než vzorek kontrolní, ovšem kontrolní vzorek mozku měl aktivitu cholinesteráz vyšší než terapeutická kombinace ATR + HI-6.

Při vzájemném srovnání tkání a zvolených terapeutických kombinací, byla nejvyšší aktivita cholinesteráz naměřena v mozkové tkáni. Vzorek označený jako „kontrola“ měl aktivitu nejvyšší a terapeuticky nejúčinnější kombinací v mozkové tkáni byla kombinace ATR + 2-PAM. Ve vzorcích potkaní krve byla nejúčinnější terapeutická kombinace ATR + HI-6, stejně tak tomu bylo u vzorků bránic.

Jako nejméně účinná terapeutická kombinace se ukázal ATR + T0 048, ovšem samotný ATR vykazoval u krevních vzorků ještě menší terapeutickou účinnost než jeho kombinace s T0 048.

Při srovnání účinnosti námi testovaných oximů se ukázalo, že oxim HI-6 byl méně toxický v porovnání s pralidoximem a obidoximem (ATR + T0 048). Terapeutické dávky oximu HI-6 korespondující s 2% LD₅₀ byly signifikantně vyšší než dávky pralidoximu a obidoximu. Všechny studované oximy byly schopny signifikantně reaktivovat RVX inhibovanou BuChE v krvi, ale jenom oxim HI-6 obnovil tuto aktivitu kompletně. Obecně je tedy oxim HI-6 nejvýhodnější. Je to také oxim, který se ukázal být neúčinnějším reaktivátorem RVX inhibované AChE v periférní části, ale jeho schopnost reaktivovat AChE inhibovanou Ruskou VX látkou v mozku byla s ostatními oximy srovnatelná.

Na potkanech intoxikované RVX se v průběhu několika minut objevilo široké spektrum klinických příznaků otravy včetně muskarinových (slinění, slzení a žvýkací) a nikotinových (třes, tonicko-klonické křeče). V případě antidotální léčby se klinické příznaky objevily později a i jejich intenzita byla slabší ve srovnání s neléčenými otravami bez ohledu na typ oximu.

6.2 SOMAN

Cílem pokusu, kdy byl aplikován soman, byl obdobný jako Experiment II. s RVX, tedy určení terapeutické účinnosti jak jednotlivých oximů, tak jejich kombinace. Jako kontrolní vzorek byla použita kombinace fyziologického roztoku a funkčního antidota (ATR). Potkani byli intoxikováni dávkou ekvivalentní 1 LD₅₀, která představovala 120,0 µg/kg.

Nejvyššího stupně reaktivity dosáhla u vzorků bránic terapeutická kombinace ATR + K 075. K-oximy (K 074 a K 075) jsou považovány za nejefektivnější reaktivátory při intoxikaci tabunem, ale jak je patrné, tak i po intoxikaci potkanů somanem mají reaktivační účinnost dosti vysokou. Terapeutická kombinace ATR + HI-6 se ukázala jako nejefektivnější reaktivátor inhibované AChE ve vzorcích potkaních mozků a tedy i nejvhodnější pro antidotní léčbu. Jejich aktivita v porovnání s kontrolním vzorkem vykazovala poloviční aktivitu. I z grafického znázornění je patrné, že nejvyšší stupeň reaktivity inhibované AChE nastal v mozkové tkáni. Na druhé straně, nejnižší stupeň reaktivity nastal u vyšetřovaných vzorků v krvi.

Nejnižší aktivita byla u skupin potkanů, který byl aplikován samotný ATR. Obdobně tomu bylo i u potkaních mozků a u krve, kdy dosahovala naměřená aktivita dokonce 4x menší hodnoty než u kontroly.

Na základě publikovaných dat se testovaný oxim HI-6 zdá být efektivní v profylaxi intoxikace somanem již v relativně nízkých dávkách. Naopak, klasické oximy jako jsou pralidoxim či obidoxim, se ukázaly být málo efektivní.²²

7 DISKUZE

Obecně platí, že účinnost reaktivátorů AChE závisí na jejich reaktivitě a afinitě enzymu inhibovanému organofosfáty, ale také závisí na struktuře inhibovaného enzymu. Reaktivita všech studovaných oximů je většinou stejná, protože jejich základní struktury jsou velmi jednoduché.²³

Výsledky provedených experimentů korespondují s výsledky demonstrovanými v předešlých experimentech, ze kterých je patrná odlišnost v terapeutické a reaktivační účinnosti mezi jednotlivými studovanými oximy.³⁰

Výsledky experimentů ukazují, že testovaný oxim HI-6 je schopný reaktivovat somanem inhibovanou AChE nejen v periferním systému (bránice), ale také v centrálním systému (mozku). Ačkoliv oxim HI-6 reaktivuje aktivitu AChE v mozku, není sice tato reaktivace dostačující k eliminaci všech symptomů nadměrné aktivity cholinergního systému, na druhé straně je dostatečná pro záchranu potkanů intoxikovaných somanem. Špatná reaktivační schopnost v mozku je vysvětlena chemickou strukturou oximu, protože se jedná o bispyridiniovou látku, která má kladný náboj. Je to také oxim, který se ukázal být nejúčinnějším k eliminaci akutních letálních účinků způsobených intoxikací potkanů RVX a k reaktivaci AChE v periferním systému intoxikovaných potkanů. Akutní toxicita RVX je většinou způsobena inhibicí periferní AChE, protože RVX, jako strukturální analog VX se dvěma kladnými náboji, velmi málo prochází přes HEB.²⁴

Toxikodynamickým důsledkem efektu RVX je tedy přednostní akumulace ACh v periferních muskarinových a nikotinových receptorech. Oxim HI-6 a H-oximy (HLÖ-7) prochází HEB, i když má kladný náboj ve své molekule. Při intoxikaci somanem došlo k manifestaci zásahu těchto oximů na úrovni mozku²⁵ a to i ohledem na to, že soman snižuje vazbu HI-6 oximu v mozku v průběhu intoxikace.²⁶

Po intoxikaci RVX byl reaktivační účinek všech studovaných oximů v centrálním nervovém systému přibližně stejný bez ohledu na typ oximu, zřejmě i proto, že inhibice AChE navozená RVX v mozku byla relativně nízká.²³

Vysoká terapeutická účinnost oximu HI-6 může být dostatečná i pro další terapeutické mechanismy, které jsou založené na přímých antimuskarinových a ganglioplegických efektech, na obnovení nervosvalového přenosu, zpomalení tvorby stárnoucího komplexu inhibitor – enzym a inhibici uvolnění ACh.²⁷

Oxim HI-6 je efektivní antidotum při intoxikaci somanem, i když jeho užití může být eliminováno několika faktory jako nestabilita ve vodném prostředí.^{26,28} Reaktivace inhibované periferní AChE je pro terapeutickou účinnost oximů důležitější než reaktivace inhibované centrální AChE. Proto oxim HI-6 může být účinnější při eliminaci

akutních letálních účinků způsobených intoxikací RVX, i když mezi námi studovanými oximy nebyl zjištěn rozdíl v jejich síle reaktivace inhibované AChE v centrálním (mozkovém) kompartmentu.

Terapeutická kombinace ATR + K 075 vykazovala největší reaktivační schopnost v periferním systému (bránice). Oxim K 075 spolu s oximem K 074 se také osvědčil jako dostatečně efektivní při reaktivaci AChE inhibované tabunem. K-oximy byly syntetizovány a in vitro byla testována jejich reaktivační účinnost u AChE inhibované tabunem. Vzájemným srovnáním jejich účinnosti se ukázalo, že oximy zavedené v Armádě České republiky (pralidoxim, obidoxim a HI-6) byly prakticky neúčinné.

K-oximy reaktivovaly AChE inhibovanou tabunem v nižší koncentraci 10^{-4} a 10^{-3} M v porovnání s ostatními oximy, kdy byla nutná koncentrace 10^{-3} a 10^{-2} M. Proto jsou K-oximy považovány za nejefektivnější reaktivátory AChE inhibované tabunem.²⁹ V našich experimentech se K 074 a K 075 také projeví jako neúčinnější reaktivátory po intoxikaci somanem v periferním systému.

Na závěr tedy lze říci, že oxim HI-6 je v současnosti považován za neúčinnější reaktivátor inhibované AChE různými NPL.³⁰ Je charakterizován vysokou afinitou k AChE inhibované RVX či VX, ale i somanem. Dále je charakterizován nejvyšším stupněm rychlosti reaktivace a v nízkých koncentracích byl schopen signifikantně reaktivovat AChE inhibované strukturálně odlišnými NPL.³¹

Výsledky ze studií provedených in vitro, stejně tak i výsledky ze studií in vivo ukazují, že oxim HI-6 je z hlediska účinnosti v porovnání s klasickými oximy (pralidoxim, obidoxim) účinnější a pro budoucí přínos v humánní medicíně má velký význam. Důvodem je vyšší pravděpodobnost k dosažení terapeutického účinku, jak v periferním, tak centrálním kompartmentu.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- ¹ Patočka, J., 2005. Základy toxikologie, kap. IV-VI, Západočeská univerzita, České Budějovice
- ² Bajgar, J., Navrátil, L., 1989. Prostaglandiny v klinické medicíně, Cholinesterázy a jejich klinický význam, Univerzita Karlova, Praha
- ³ Bajgar, J., Fusek, J., Patočka, J., 1979. Extrémně toxické nízkomolekulární syntetické jedy, VLDVDU HK
- ⁴ Prokeš, J., a kol., 2005 Základy toxikologie I., Karolinum, Praha
- ⁵ Patočka, J., Jun, D., Kuča, K., 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body, *Acta medica* 47(4):215-28
- ⁶ Vopršalová, M., Žáčková, P., 1996. Toxikologie pro farmaceuty, Univerzita Karlova, Praha
- ⁷ Patočka J. a kol.; 2004. Vojenská toxikologie, Grada Publishing, Praha, str. 30 – 44.
- ⁸ Kassa, J., Kuča, K., 2006. The reactivating and Therapeutical efficacy of currently available oximes to counteract Russian VX poisonings in rats and mice, *Int J Toxicol.* 25(5):397-401
- ⁹ <http://en.wikipedia.org>
- ¹⁰ Filliat, P., Coubard, S., Pierard, C., Liscia, P., and col., 2006. Long-term behavioral consequences of soman poisoning in mice, *Neurotoxicology.* Nov.18.
- ¹¹ Lullmann, H., Mohr, K., Wehling, M., 2002. Farmakologie a toxikologie, Grada
- ¹² Worek, F., Szinicz, L., Eyer, P., Thiermann, H., 2005. Evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning: development of kinetic-based dynamic, *Toxicol Appl Pharmacol.* 209(3):193-202
- ¹³ Fine RE, 1999. The biochemistry of Alzheimer disease, *Alzheimer, Dis Assoc Disord.* 13 Suppl 1:S82-7
- ¹⁴ Giacobini, E., 2004. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease, *Pharmacol Res.* 50(4):433-40
- ¹⁵ Hartl, J., Palát, K., Doležal, M., Miletín, M., Opletalová, V., 2001. Farmaceutická chemie II/1, Univerzita Karlova, Praha
- ¹⁶ Alptuzun, V., Kapková, P., Baumann, K., Erciyas, E., Holzgrabe U., 2003. Synthesis and biological activity of pyridinium-type acetylcholinesterase inhibitors, *J Pharm. Pharmacol.* 55(10):1397-404
- ¹⁷ Wilson, IB., Ginsburg, S., 1995. Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphate, *Arch Biochem.* 54(2):569-71
- ¹⁸ Hackley, Jr., Steinery, GM., Lamb, JC., 1991. Formation of potent inhibitors of AChE by reaction of pyridinaldoximes with isopropyl methylphosphonofluoridate, *Toxicol. Sci.* 17: 208-214

-
- ¹⁹ Štěpánková, S., Vránová, M., Zdražilová, P., Komers, K., Komersová, A., Cegan, A., 2005. Two new methods monitoring kinetics of hydrolysis of acetylcholine and acetylthiocholine, *Z Naturforsch*, 60(11-12):943-6
- ²⁰ Komersová, A., Komers, K., Zdražilová, P., 2005. Kinetic of hydrolysis acetylthiocholine and acetylcholine by cholinesterases, *Chem Biol Interact*. Dec 15;157-158:387-8
- ²¹ Bajgar, J., Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi-možná modifikace pro polní použití, *Vojenské listy* roč.XLI. č.2
- ²² Kassa, J., Cabal, J., 1999. Comparison of the efficacy of a new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with currently available oximes and H oximes against soman by in vitro and in vivo methods. *Toxicol*. 132:111-118
- ²³ Shih, T.-M., 1993. Comparison of several oximes on reactivation of soman-inhibited blood, brain and tissue cholinesterase activity in rats. *Arch. Toxicol*. 67, 637
- ²⁴ Mars, T.C.M., 1993. Organophosphorus compounds. *Pharmacol. Ther*. 58:51-66
- Bajgar, J. 2004. Organophosphates/nerve agent poisoning : mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv Clin Chem* 38:151-216
- ²⁵ Clement, J.G., Hansen and C.A. Boulet, 1992. Efficacy of HL6-7 and pyridoxime as antidotes of nerve agent poisoning in mice. *Arch. Toxicol*. 66:216-219
- ²⁶ Cassel, G., Karlsson, L., Warra, L., Wee, K., Goransson-Nyberg, A., 1997. Pharmacokinetics and effects of HI-6 in blood and brain of soman – intoxicated rats: A microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 332:43-52
- ²⁷ Rousseaux, C.G., Dua, A.K., 1989. Pharmacology of HI-6, and H-series oxime. *Can J. Physiol. Pharmacol*. 67, 1183
- Eyer, P., Hagedorn, I., Klimmek, R., Lippstreu, P., Löffler, M., Oldiges, H., Spöhrer, U., Steidl, J., Szinicz, L., Worek, F., 1992. HL6-7 dimethanesulfonate, a potent bispyridinium-dioxime against cholinesterases. *Arch. Toxicol*. 66, 603
- Van Helden, H.P.M., Busker, R.W., Melchers, B.P.C., Bruijnzeel, P.B.L., 1996. *Pharmacological Calculation with Computer Programs*. Springer, New York, p. 145
- ²⁸ Eyer, P., Lodstetter, B., Schafer, W., Sonnenbichler, J., 1989. Studies on stability and decomposition of the Hagedorn oxime HL6-7 in aqueous solution. *Arch. Toxicol*. 66, 603
- ²⁹ Kuča, K., Cabal, J., Musilek, K., Jun, D., Bajgar, J., 2005. Effective bisquaternary reactivators of tabun-inhibited AChE. *J. Appl. Toxicol*. 25: 491-495
- ³⁰ Dawson, R.M. 1994. Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *J. Appl. Toxicol*. 14:317-331
- Kassa, J. 2002. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol Clin Toxicol*. 40:803-816
- ³¹ Kuča, K., Jun, D., Cabal, J., Hrabínová, M., Bartošová, L., Opletalová, V., 2006. Russian VX: Inhibition and reactivation of acetylcholinesterase and its comparison with VX-agent. *Basic Clin. Pharmacol Toxicol*. 98:389-394