

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



**Porovnání účinků smrtné a maximální
tolerované dávky standardních
acetylcholinesterasových reaktivátorů.**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Žárská Nikola

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martina Hrabínová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Bc. Žárská Nikola

Poděkování

Nejprve bych touto cestou ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce PharmDr. Miroslavovi Kovaříkovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky při řešení dané problematiky. Velké díky patří především Mgr. Martině Hrabinové za její odborné vedení, pomoc a čas, který mi při realizaci mé práce poskytla. Děkuji také všem zaměstnancům katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany za poskytnutí pracovních pomůcek a prostoru.

A v neposlední řadě také děkuji mé rodině a příteli za jejich optimismus a podporu, kterou mi v posledních měsících při psaní této práce věnovali.

„Prohlašuji, že tato diplomová 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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 1. 5. 2019

.....

Žárská Nikola

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra	biologických a lékařských věd
Kandidát	Bc. Nikola Žárská
Vedoucí	PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Martina Hrabínová
Název diplomové práce	Porovnání účinků smrtné a maximální tolerované dávky standardních acetylcholinesterasových reaktivátorů.

Diplomová práce se zabývá tématem nervově paralytických látek. Konkrétně demonstruje reaktivační účinek oximu HI-6 vůči sarinem inhibované acetylcholinesterasy v dávce 5 % střední smrtné dávky a 100 % maximální tolerované dávky. Experiment byl prováděn *in vivo* na myších Balb/c. K léčbě byl aplikován buď samotný oxim HI-6, ve výše zmíněných dávkách, nebo v kombinaci s parasymptolytikem atropinem. Změna aktivity acetylcholinesterasy byla měřena spektrofotometricky modifikovanou metodou dle Ellmana v krvi a v mozku. U myší léčených dávkou 100 % maximální tolerované dávky HI-6 nebyly pozorovány žádné známky intoxikace sarinem, na rozdíl od myší léčených pouze atropinem a 5 % střední smrtné dávky HI-6. Bylo zjištěno, že po *i.m* podání 100 % maximální tolerované dávky, dosáhla koncentrace HI-6 500 μM v plasmě a 10 μM v mozku. Taková koncentrace je bezpečná, ale není bohužel pro klinickou praxi relevantní, protože způsobuje mírné až středně závažné vedlejší účinky.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate Bc. Nikola Žárská

Supervisor PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Consultant Mgr. Martina Hrabínová

Title of Thesis A comparison of lethal and maximum tolerated dose of standard acetylcholinesterase reactivators.

Diploma thesis deals with the topic of nerve agents. Specifically, it demonstrates the reactivating effect of oxime HI-6 (at 100 % maximum tolerated dose and 5 % median lethal dose) on the acetylcholinesterase inhibited by sarin. The experiment was carried out *in vivo* in Balb/c mice. The treatment was administered either with oxime HI-6 alone, in the above-mentioned doses, or in combination with the parasympatholytic atropine. The change in activity of acetylcholinesterase was measured by spectrophotometrically method, modified by the Ellman, in blood and brain. There were no signs of sarin intoxication in mice, that where treated with 100 % maximum tolerated dose of HI-6, in compare to mice treated with atropine only and 5 % median lethal dose of HI-6, where the intoxication was observed. It was founded that after *i.m* administration of 100 % maximum tolerated dose, the HI-6 concentration reached 500 μM in plasma and 10 μM in brain. This concentration is safe, but for medical purpose irrelevant because it causes mild to moderate side effects.

Obsah

1	Seznam použitých zkratk	- 8 -
2	Úvod	- 9 -
3	Teoretická část	- 11 -
3.1	Nervově paralytické látky	- 11 -
3.1.1	Historie	- 11 -
3.1.2	Rozdělení	- 13 -
3.1.3	Mechanismus účinku	- 17 -
3.1.4	Klinické příznaky	- 20 -
3.1.5	Léčba	- 21 -
3.2	Reaktivátory acetylcholinesterasy	- 23 -
3.2.1	Rozdělení	- 24 -
3.2.2	Účinky	- 27 -
3.2.3	Nové trendy	- 27 -
3.3	LD ₅₀	- 30 -
3.4	MTD	- 31 -
4	Cíl	- 32 -
5	Experimentální část	- 33 -
5.1	Princip metody	- 33 -
5.2	Příprava základních roztoků	- 35 -
5.2.1	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB)	- 35 -
5.2.2	Acetylthiocholin jodid (ATChJ)	- 35 -
5.2.3	Tris 0,1 M	- 35 -
5.2.4	Tris 0,02 M	- 35 -
5.2.5	Cystein chlorid	- 35 -
5.3	Chemikálie	- 36 -
5.4	Přístroje a pomůcky	- 36 -
5.5	Zvířata	- 36 -
5.6	Průběh experimentu	- 37 -
5.7	Sestrojení kalibrační závislosti	- 38 -
5.8	Postup stanovení aktivity inhibitorů AChE	- 39 -

5.8.1	V krvi	- 39 -
5.8.2	V mozku.....	- 39 -
6	Výsledky	- 40 -
6.1	Zpracování experimentálních dat	- 40 -
6.2	Experimentální data.....	- 40 -
7	Diskuse.....	- 43 -
8	Závěr	- 47 -
9	Seznam rovnic.....	- 48 -
10	Seznam tabulek	- 49 -
11	Seznam obrázků	- 50 -
12	Bibliografie	- 51 -

1 Seznam použitých zkratek

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
BuChe	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervový systém
DAM	diacetylmonooxim
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
HEB	hematoencefalická bariéra
HI-6	asoxim
IMS	přechodný syndrom
LD ₅₀	střední smrtná dávka
LueH-4	obidoxim
MTD	maximální tolerovaná dávka
MINA	monoisnitrosoaceton
MMC-4	methoxim
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
NPL	nervově paralytické látky
PNS	periferní nervový systém
TMB-4	trimedoxim
TNB ⁻	5-thio-2-nitrobenzoový aniont
2-PAM	pralidoxim

2 Úvod

Diplomovou prací na téma: „porovnání účinků smrtné a maximální tolerované dávky standardních acetylcholinesterasových reaktivátorů“ jsem si vybrala ve vztahu ke způsobu, jakým demonstrovuje problematiku nervově paralytických látek (NPL), která je stále aktuálnější, jak už bylo v posledních desetiletích několikrát dokázáno. Myslím si, že tato problematika má relevantní dopady na společnost i svět jako takový. Považuji tedy za důležité se tímto tématem zabývat podrobněji.

NPL jsou velmi toxické sloučeniny, jejichž cílovou strukturou, po vstupu do organismu, je enzym acetylcholinesterasa (AChE). Místem působení AChE je centrální nervový systém (CNS) i periferní nervový systém (PNS), kde tento enzym hydrolyzuje neurotransmitter acetylcholin (ACh), který je zodpovědný za přenos nervového vzruchu a za stimulaci koncového orgánu k jeho činnosti. Mezi typické zástupce NPL patří sloučeniny jako sarin, soman, tabun nebo třeba látka zvaná Novičok. V důsledku interakce AChE s NPL dochází k její, mnohdy, nevratné inhibici, která má za následek hromadění acetylcholinu na nervových synapsích. Výsledkem inhibice AChE je neustálá stimulace cholinergních receptorů (muskarinových nebo nikotinových) způsobující cholinergní příznaky typické pro intoxikaci NPL (mióza, slinění, slzení, dechové obtíže, křeče kosterního svalstva aj.), které mohou vést k tzv. cholinergní krizi nebo k úmrtí jedince následkem poruchy dýchacích svalů a deprese dýchacího centra v CNS. Základem terapie otrav NPL je současné podání parasympatolytika, nejčastěji atropinu, antikonzulziva a tzv. reaktivátoru AChE, který hydrolyzuje inhibovaný enzym a obnovuje jeho původní funkci. Na trhu se setkáme s celou řadou standardních reaktivátorů určených jak pro armádní první pomoc, tak i pro lékařskou odbornou první pomoc. Jedním z nich je také oxim HI-6, který disponuje širokým spektrem účinku.

Ačkoliv byla v průběhu posledních desítek let na syntetizována celá řada slibných sloučenin k reaktivaci inhibované AChE, stále neexistuje žádný širokospektrý reaktivátor, který by dokázal plně obnovit funkci AChE inhibované všemi typy NPL. Vzhledem k nedávným případům je riziko použití NPL proti civilnímu obyvatelstvu nebo jejich zneužití ve válce stále aktuálnější, proto cílem výzkumných týmů po celém světě, zabývajících se právě NPL, je v první řadě odstranit nevýhody současně podávaných reaktivátorů a najít reaktivátor s co nejširším spektrem účinku.

Hlavním cílem této diplomové práce je srovnání účinnosti reaktivace komerčně dostupného reaktivátoru HI-6 (jako představitele zastupujícího skupinu standardních reaktivátorů) v dávce 5 % střední smrtné dávky (LD_{50}) a 100 % maximální tolerované dávky (MTD) po intramuskulárním podání jedné LD_{50} sarinu laboratorní myši Balb/C na základě naměřené aktivity AChE v krvi a v mozku. Dílčím cílem je realizace rešerše ve vztahu k aspektům a pojmům důležitým k pochopení části praktické.

Práce ve výsledku zkoumá pouze vztah jednoho reaktivátoru HI-6 jako vybraného reprezentanta skupiny standardních reaktivátorů k reaktivaci sarinem inhibované AChE. Výsledky měření ostatních skupin mi nebyly ke zpracování této diplomové práce poskytnuty. Data, ze kterých jsem vycházela se vztahují pouze k výše zmíněnému reaktivátoru HI-6.

3 Teoretická část

3.1 Nervově paralytické látky

NPL patří mezi organické sloučeniny fosforu. Jsou považovány za jeden z nejnebezpečnějších chemických bojových prostředků, řazených mezi chemické zbraně hromadného ničení. Vyznačují se vysokou toxicitou, rychlým nástupem účinku a mimořádně vysokou rozpustností v tucích, díky které mohou pronikat do organismu všemi branami vstupu, včetně neporušené kůže. Snadno překonávají i hematoencefalickou bariéru (HEB). Jejich syntéza je poměrně snadná a levná, proto mohou být vojensky i teroristicky snadno zneužitelné [1–3].

Strukturně podobné látky jsou široce používány také v zemědělství jako pesticidy (např. Chlorpyrifos, Malathionin, Paraoxon aj.), ve veterinární medicíně nebo v průmyslu jako změkčovadla a přísady do maziv [4].

3.1.1 Historie

Objev a vývoj NPL souvisí především s rozvojem pesticidů. O první jednoduchou syntézu organofosforové sloučeniny, konkrétně o tetraethylpyrofosfát, se pokusil již v roce 1854 francouzský organický chemik Philippe de Clermont, avšak velkého významu nabyly tyto sloučeniny teprve na počátku 20. století [5].

Německý chemik Gerhard Schrader, působící v koncernu IG Farben, s dalšími vědeckými pracovníky zahájili v roce 1934 výzkum organických fluorosloučenin a fluorofosforových sloučenin, který o rok později vedl k objevu významné toxické látky N,N-dimethylamidofosorylfluoridu. Tento objev přispěl posléze k přípravě celé řady vojensky významných látek, jako jsou tabun, sarin a soman. Ačkoliv prvotním úmyslem těchto vědců bylo vyvinout účinné pesticidy proti hmyzu a drobným savcům, byla orientace výzkumu cíleně změněna vlivem nastupující 2. světové války [6, 7].

Tabun byl poprvé syntetizován 23. prosince 1936 Langem a Krügerovou pod vedením Gerharda Schradera. Po zahájení výroby byl vybudován závod v Dyhernfurthu, který od dubna 1942 do začátku roku 1945 vyrobil přibližně 30 000 tun tabunu. Mezitím Schraderova skupina pokračovala v syntéze sloučenin fosforu a fluoru. Jednou z nejtoxičtějších látek byl sarin, pojmenovaný podle svých objevitelů Schrader, Ambros, Ritter a Linde. V SSSR byl sarin syntetizován až v roce 1943 Alexandrem

Arbuzovem a Martinem Kabačnikem ze Zelinského ústavu organické chemie v Moskvě [8].

Německý chemik Richard Kuhn na základě studií tabunu a sarinu objasnil mechanismus jejich působení na lidský organismus a v rámci svého výzkumu objevil v roce 1944 pinakolylový analog sarinu, dnes známý jako soman. Podle některých zdrojů stačilo Německo do konce 2. světové války vyrobit přibližně 50 tun somanu [7, 8].

Po rozsáhlých farmakologických a chemických studiích objevila v 50. letech německá laboratoř Farbenfabriken Bayer ve Wupertalu-Eberfeldu NPL s kódovým označením VX. V dubnu roku 1961 zahájila USA její výrobu v newportském vojenském závodě a do roku 1968 připravila asi 4500 tun této sloučeniny. Struktura VX byla dlouhou dobu utajována, veřejně byla odhalena teprve po incidentu v březnu 1968, kdy při jejím testování, v Dugway Proving Ground, americkou armádou zahynulo asi 6000 ovcí [6, 8]

V 70. letech byla v USA studována v rámci programu Intermediate Volatility Agent série NPL označených jako GV, jejichž vývoj zakončily USA zavedením látky VX do výzbroje a později i další sloučeninou z této skupiny, známou jako IVA (název odvozený z výše zmíněného programu – látka se střední těkavostí). Ve stejných letech byl v Sovětském Svazu, nezávisle na USA, připraven isomer látky VX (kódové označení VR), který se stal v pozdějších letech vzorem pro syntézu další generace bojových látek, dnes známých jako Novičok [9]. Prekurzory těchto látek byly vyvíjeny v rámci tajného programu s kódovým označením Foliant. Cílem tohoto programu bylo v první řadě připravit látku, která nebude detekovatelná chemickými detekčními přístroji organizace NATO, ale přesto bude schopna pronikat do těla nepřátelských vojáků bez ohledu na použití individuálních ochranných pomůcek a nebude uvedena v seznamu zakázaných prekurzorů Úmluvy o chemických zbraních [9, 10].

I přes masivní výrobu NPL v průběhu druhé světové války nebylo prokázáno jejich zneužití k válečným účelům. Za první doložený příklad použití NPL ve válce, konkrétně sarinu a tabunu, je považován až ozbrojený konflikt mezi Irákem a Íránem probíhající v letech 1980 – 1988 [11]. Dalším známým incidentem zneužití NPL bylo úmyslné použití sarinu proti civilnímu obyvatelstvu v Tokijském metru 20. března roku 1995. Tento teroristický útok, při kterém bylo zabito celkem 12 lidí a dalších 5500 nevinných

lidí bylo zraněno, byl spáchán členy hlásících se k japonskému kultu Óm Šinrikjó. Jednalo se o první teroristický útok na světě provedený NPL [12–15]. Četné důkazy také nasvědčují nezákonnému použití sarinu v průběhu občanské války v Sýrii v roce 2013. Na následky expozice sarinem zemřelo tehdy přibližně 1729 lidí [16, 17]. Předběžné toxikologické testy z roku 2018 prokázaly použití látky VX jako chemické zbraně k odstranění Kim Čong-nama, který byl zabit 13. února v roce 2016 na letišti Kuala Lumpur v hlavním městě Malajsie. Spekuluje se, že útok byl spáchán na popud jeho bratra Kim Čong-una, současného severokorejského vůdce [18]. Jedním z posledních případů zneužití NPL je kauza otráveného ruského špiona Sergeje Skripala, který byl nalezen, společně s dcerou, 5. března 2018 v obchodním centru v anglickém Salisbury. Jed, kterým byl otráven, patří do skupiny NPL Novičok [19].

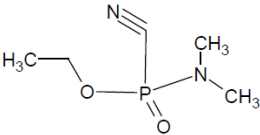
Hrozba intoxikací NPL v současné době neustala, ba naopak stále stoupá, a to především, s rostoucí obavou z teroristických útoků. Ohroženou skupinou tak není pouze armáda, ale i civilní obyvatelstvo, což představuje hlavní důvod studie NPL.

3.1.2 Rozdělení

NPL lze rozdělit na dvě velké skupiny, které jsou obecně označovány jako V látky a G látky [20]. Zvláštním příkladem NPL je látka IVA, která se svým chemickým složením pohybuje mezi G a V látkami, a skupina látek zvaných Novičok.

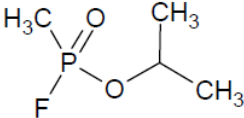
3.1.2.1 G látky

Jedná se o bezbarvé kapaliny podobné vodě, které mohou mít nepatrný ovocný, thiolový nebo žádný zápach [21]. Dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech. Charakteristickou vlastností je jejich vysoká těkavost, díky které mohou velmi snadno vstupovat do organismu skrze dýchací cesty nebo transdermální cestou [22]. Jejich vytrvalost v bojovém poli je až několik hodin v závislosti na počasí [23]. G látky v porovnání s V látkami daleko rychleji inhibují AChE [24]. LD₅₀ v ovzduší, která již po první minutě po expozici vyvolá smrt u 50 % nechráněných exponovaných osob, se pohybuje v rozmezí 0,03 – 0,08 mg.l⁻¹. LD₅₀ při zamoření nechráněné kůže se pohybuje mezi 0,7 – 7 mg.kg⁻¹ hmotnosti exponovaného jedince [3, 25]. Zástupci této skupiny jsou tabun (tabulka č. 1), sarin (tabulka č. 2), soman (tabulka č. 3) a cyklosin (tabulka č. 4).

Tabun	
Chemický vzorec	
Chemický název	ethyl-dimethylfosforamidokyanidát
Kódové označení	GA (USA), Trilon 83, T-83 (Německo)
Charakteristika	kapalina se slabou ovocnou vůní
Inhalační toxicita LC ₅₀ (mg.min.m ⁻³)	100-200
Perkutánní toxicita LD ₅₀ (mg na osobu)	200-1500

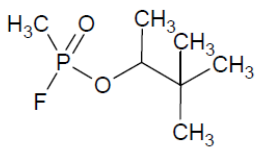
Tabulka 1 Přehled základních informací o tabunu.

Zdroj: [7]

Sarin	
Chemický vzorec	
Chemický název	isopropyl-methylfosfonofluoridát
Kódové označení	GB (USA), Trilon 144, T-144 (Německo), R-35 (Rusko)
Charakteristika	bezbarvá kapalina bez zápachu
Inhalační toxicita LC ₅₀ (mg.min.m ⁻³)	35-100
Perkutánní toxicita LD ₅₀ (mg na osobu)	100-1700

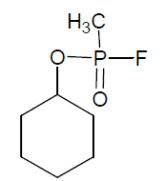
Tabulka 2 Přehled základních informací o sarinu.

Zdroj: [7]

Soman	
Chemický vzorec	
Chemický název	(3,3-dimethyl-2-butyl)-methylfosfonofluoridát
Kódové označení	GD (USA), Trilon (Německo), R-55 (Rusko)
Charakteristika	bezbarvá kapalina s výraznou kafrovitou vůní
Inhalační toxicita LC ₅₀ (mg.min.m ⁻³)	25-28
Perkutánní toxicita LD ₅₀ (mg na osobu)	50-350

Tabulka 3 Přehled základních informací o somanu.

Zdroj: [7]

Cyklosin (cyklosarin)	
Chemický vzorec	
Chemický název	cyklohexyl-methylfosfonofluoridát
Kódové označení	GF (USA)
Charakteristika	bezbarvá kapalina s ovocnou vůní
Inhalační toxicita LC ₅₀ (mg.min.m ⁻³)	35
Perkutánní toxicita LD ₅₀ (mg na osobu)	30-350

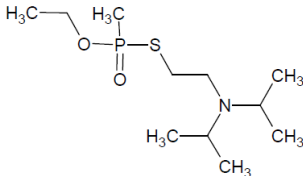
Tabulka 4 Přehled základních informací o cyklosinu.

Zdroj: [7]

3.1.2.2 V látky

V látky jsou bezbarvé kapaliny bez výraznějšího zápachu a s velmi nízkou těkavostí, proto je nejvýhodnější aplikace v podobě aerosolu. Snadno je rozpustíme v tucích, méně ve vodě. V důsledku toho mohou přetrvávat v terénu i ve vodě několik týdnů až měsíců po jejich uvolnění. Jsou toxicitější než G látky, obzvláště při intoxikaci nechráněné kůže [23].

Hlavním představitelem této skupiny je bojová látka s označením VX, která proniká do organismu celým povrchem těla a je přibližně 100x toxicitější než sarin. LD₅₀ aerosolu látky VX v ovzduší, která již po 1 minutové expozici vyvolává smrt u 50 % exponovaných nechráněných osob, činí 0,036 mg.l⁻¹. LD₅₀ při zamoření nechráněné kůže se pohybuje kolem 0,07 mg.kg⁻¹ hmotnosti exponovaného jedince [3, 25].

VX látka	
Chemický vzorec	
Chemický název:	S-(2-(diisopropylamino)ethyl)-O-ethylmethylfosfonothiát
Kódové označení	VX, EA-1701 (USA)
Charakteristika	olejovitá kapalina bez zápachu
Inhalační toxicita LC _{t50} (mg.min.m ⁻³)	5-100
Perkutánní toxicita LD ₅₀ (mg na osobu)	5-15

Tabulka 5 Přehled základních informací o VX.

Zdroj: [7]

Zvláštním příkladem NPL je látka IVA, která se svým chemickým složením pohybuje mezi G a V látkami, jak už bylo zmíněno výše. V terénu vydrží déle než G látky, ale není tak stálá jako VX (Tento problém však byl řešen konstrukcí binární munice IVA-2) [23]. Oproti VX má vyšší těkavost, která je ale nižší než u G látek. LD₅₀ při zamoření nechráněné kůže se pohybuje kolem 1,36 mg.kg⁻¹ hmotnosti exponovaného jedince [3].

3.1.2.3 A-látky

V současnosti se v literatuře setkáme s rozdělením NPL na dvě podskupiny – látky G a látky V. Nicméně, M. Kloske ve svém článku z roku 2018 pojednává o zavedení nové podskupiny s označením A, do které lze zařadit NPL zvané Noviček [10].

Noviček je skupina NPL s velmi vysokou toxicitou, udává se, že jsou 5-10 x silnější než látka VX [26]. Jsou k dispozici v tekuté formě, ale mohou být také přeměněny na prášek adsorpcí jejich kapalně formy na pevný nosič, kterým může být např. silikagel. Ačkoliv přesná struktura těchto sloučenin není zcela známá, předpokládá se, že se jedná o organofosfáty obsahující dihaloformaldoxim. Lze je použít jak v jednotných, tak i v binárních formách. Ačkoliv název Noviček prvotně pojmenovával pouze binární formu těchto NPL, tak ve většině publikací se označení Noviček používá jak pro binární chemické zbraně, tak i pro jednotlivé NPL [10, 26]. Mechanismus účinku Novičku je identický jako mechanismus kterékoli jiné NPL, avšak kromě inhibice AChE se mohou tyto NPL vázat také na periferní senzorní nervy, proto expozice vysoké dávce těchto sloučenin nebo zpožděná léčba může vést k masivní periferní neuropatii [26].

Prvními syntetizovanými jednotnými NPL byly A-230, A-232 a A-234. Ze základní struktury A-232 byla syntetizována binární munice Noviček-5. Binární munice je plněna dvěma samostatnými relativně netoxickými složkami, které se v průběhu letu na cíl smísí a vytvoří toxickou sloučeninu. Binární technologie nabízí celou řadu výhod: zvyšuje bezpečnost při výrobě, skladování i při použití NPL, zvyšuje stabilitu NPL a taktéž omezuje její degradaci [9, 23].

3.1.3 Mechanismus účinku

NPL působí na nervový systém narušením cholinergního přenosu nervového vzruchu, který je zprostředkován chemickou látkou ACh. ACh působí jako neurotransmitter na synapsích CNS, na postgangliových vláknech parasympatiku i sympatiku a na gangliových buňkách. Organismus ho syntetizuje z cholinu prostřednictvím acetylkoenzymu A. Uskladněn je v zásobních vezikulách a na základě akčního potenciálu je uvolněn do synaptické štěrbině, kde se může vázat na postsynaptické nebo presynaptické acetylcholinové receptory (muskarinové či nikotinové), a následně tak stimulovat koncový orgán k reakci [21, 27]. Aby působil pouze po dobu nezbytně nutnou pro přenos vzruchu a nedošlo tak k jeho akumulaci

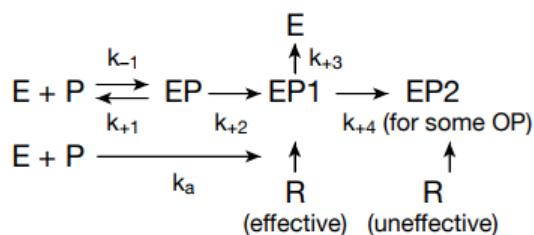
a k nadměrné stimulaci koncových orgánů, musí být následně degradován pomocí enzymu zvaného AChE [28]. Jedna molekula AChE je schopná hydrolyzovat 6×10^5 molekul ACh za minutu [29].

AChE patří do skupiny serinových proteáz a lze ji nalézt v centrálním i periferním nervovém systému, v neuromuskulárních spojích a v neposlední řadě i na povrchu červených krvinek [30]. Nejdůležitějším místem AChE je tzv. aktivní místo ležící v dolní části hluboké štěrby, která je lemována čtrnácti aromatickými zbytky vytvářejícími tzv. acylovou kapsu, definující substrátovou specifitu tohoto enzymu. Aktivní centrum je složeno ze dvou podjednotek: katalytické nebo-li esterové a anionické. Esterová část, obsahující katalytickou triádu Serin 200, Histidin 440 a Glutamin 327, je zodpovědná za vlastní katalytickou funkci AChE. Naproti tomu anionická část, jež je tvořena Tryptofanem 84, Fenylalaninem 330 a Fenylalaninem 331, váže kvartérní skupinu substrátu, kterým je ACh. Stejným způsobem také dochází k vazbě kvartérních oximů, které se uplatňují v reaktivaci inhibované AChE [30, 31]. Kromě aktivního místa obsahuje AChE jednu nebo více periferních anionických míst vázících kromě ACh i kvartérní nekompetitivní inhibitory [30].

K degradaci ACh prostřednictvím AChE dochází nukleofilní interakcí acylové skupiny ACh s hydroxylovou skupinou serinu, který se nachází v aktivním místě AChE. Následkem reakce je tvorba přechodného kovalentně vázaného komplexu mezi substrátem a enzymem. Inhibice aktivního místa způsobí dočasnou inaktivaci enzymu. Funkce enzymu je obnovena až hydrolýzou kovalentně vázaného komplexu, za současného uvolnění acetátu a cholinu, který je transportován zpět do nervových zakončení, kde slouží jako substrát k syntéze nových molekul ACh [32, 33].

Toxický účinek NPL je zprostředkován obdobným mechanismem. NPL interaguje s aktivním centrem AChE a způsobuje fosforylaci hydroxylové skupiny serinu. Vzniká tak kovalentně vázaný komplex NPL a AChE [31]. Vzniklý komplex lze, hydrolýzou kovalentní vazby mezi atomem fosforu NPL a serinem AChE, zpětně reaktivovat. Avšak v některých případech může dojít k procesu zvaném stárnutí, přesněji k tzv. dealkylaci fosforylované AChE, během které vzniká v molekule záporně nabitý fosfát, vytvářející solný můstek s katalytickým histidinem [34]. Komplex se tak dostává do již nereaktivovatelné formy a jediným způsobem, jak obnovit aktivitu AChE,

je syntéza nových enzymů. Následující obrázek č. 1 schématicky znázorňuje interakci mezi inhibitorem a AChE [29, 35, 36].



Obrázek 1 Mechanismus účinku NPL

Mezi inhibitorem (P) a enzymem (E) dochází ke tvorbě intermediárního komplexu (EP), který je v následném kroku fosforylován za vzniku kovalentně vázaného komplexu (EP1).

Zdroj: [35]

Inhibice AChE NPL způsobí akumulaci ACh v místech jeho fyziologického působení, která postupně vede k nadměrné stimulaci nikotinových a muskarinových receptorů cholinergního přenosu, nastává tak konstantní depolarizace postsynaptických neuronů [25, 37]. V důsledku zvýšené cholinergní aktivity dochází u exponovaného jedince k rozvoji klinických příznaků (tzv. akutní cholinergní krize), a to do doby, dokud není syntetizován nový ACh nebo je použit reaktivátor [37].

Erytrocytární cholinesterasa a butyrylcholinesterasa (BuChE) se v praxi uplatňují jako citlivé diagnostické markery pro potvrzení expozice NPL [22, 32]. Osoby s vyšším rizikem expozice NPL jsou pravidelně monitorovány měřením aktivity krevních cholinesteras. Kromě vojáků a laboratorních vědců pracujících s NPL jsou významně ohroženi také zemědělci a další osoby, které manipulují nebo jsou v bezprostředním kontaktu s insekticidy. (Pokud naměříme aktivitu krevní cholinesterasy 75 % a méně, znamená to, že osoba byla exponována NPL a je stažena z práce.) [11].

3.1.4 Klinické příznaky

Otrava NPL může mít tři hlavní klinické syndromy: prvním z nich je akutní cholinergní syndrom; druhý, přechodný syndrom (IMS, z anglického Intermediate syndrome); a třetí, periferní neuropatie [30].

Akutní toxicita AChE vzniká z nekontrolovatelné akumulace ACh na cholinergních synapsích a může vést až k cholinergnímu syndromu [30]. Prvními zcela charakteristickými symptomy při zasažení organismu NPL jsou mióza (zúžení očních zorniček), poruchy vidění, pocit tlaku i bolesti v očích, bolesti hlavy, zvýšená sekrece z nosu, slinění, slzení, dýchací obtíže, popřípadě ztráta vědomí. Zvýšení ACh na muskulárních a nervových nikotinových receptorech vyvolává svalovou ochablost, třes, záškuby až křeče jednotlivých příčně pruhovaných svalů v závislosti na obdržené dávce. V posledním stádiu vznikají tonicko-klonické křeče, které mohou vést až k paralýze kosterního svalstva. Bezprostřední příčinou smrti bývá akutní respirační insuficience v důsledku narušení funkce dýchacích center v CNS a paralýzy dýchacích svalů, což postupně vede k zástavě dechu s následnou zástavou srdce [25, 38, 39].

IMS se vyskytuje 24 až 96 hodin po prodělání akutní cholinergní krize a je charakterizován hyporeflexií, proximální svalovou slabostí, abnormalitami kraniálních nervů a paralýzou dýchacích svalů a bránice [21]. IMS může přetrvávat až několik týdnů, přičemž rozsah postižení se u jednotlivých pacientů může značně lišit [40].

Zvýšená hladina ACh dává taktéž rychle vzniknout velkému množství glutamátu v CNS, který aktivuje tzv. AMPA a NMDA receptory. Na aktivaci NMDA se kromě glutamátu podílí také intracelulární akumulace Ca^{2+} iontů a nadprodukce volných radikálů [29]. Výsledkem je morfologické poškození nervové tkáně vedoucí až k buněčné smrti neuronů [41].

U NPL byly pozorovány kromě účinků na cholinergní systém také účinky nespecifické (někdy označované jako necholinergní), které se manifestují později. Zasahují do metabolismu nukleových kyselin a bílkovin a výsledkem takového zásahu může být navození mutace nebo ovlivnění imunitních pochodů. NPL mohou také způsobovat hepatotoxicitu [3].

Obecně platí, že klinické symptomy inhalační toxicity NPL se vyvíjejí rychleji (30-120 s), ale samotná klinická závažnost závisí na koncentraci par NPL a na délce jejich expozice. Naproti tomu při transdermální expozici se systémová toxicita zpomaluje, protože NPL difundují přes kůži [22].

3.1.5 Léčba

Intoxikace NPL se řeší obvykle dvěma léčebnými strategiemi. První z nich je strategie označovaná jako pre-treatment, určená především pro vojáky a zdravotnický personál, která spočívá v ochraně organismu proti útoku NPL. Lze ji docílit použitím reverzních AChE inhibitorů (např. pyridostigmin chlorid), stechiometrických bioscavengerů (např. rekombinantní BuChE) nebo katalytických bioscavengerů (např. fosfotriesterasa). Druhý léčebný postup bývá označován jako tzv. post-treatment, jejíž cílem je vyléčit již intoxikovaný organismus, kde je kromě kauzální léčby, zahrnuta také léčba symptomatická (odstranění sekretů, podávání kyslíku, umělá ventilace aj.) [29, 42].

Základem terapie otrav NPL je antidotní terapie, kterou je potřeba zahájit co nejdříve. Nynější léčebný režim pro NPL zahrnuje současné podání antikonvulziva, parasympatolytika a reaktivátoru AChE [43]. Nejčastějším podávaným parasympatolytikem je atropin, který funguje jako konkurenční antagonist proti nadměrnému ACh, vazbou na muskarinové receptory v PNS a v CNS. Atropin však není schopen omezit nadměrnou stimulaci nikotinových receptorů a stejně tak není schopen reaktivovat inhibovanou AChE. Ve skutečnosti poskytuje čistě symptomatickou úlevu. Tento lék navíc může indukovat svou vlastní anticholinergní toxicitu projevující se např. rozmazaným viděním, rozšířenými žilami nebo tachykardií [29, 44].

Jako antikonvulzivum se obvykle podává diazepam v dávce 10 mg i.m., z rodiny benzodiazepinů, který snižuje nervosvalové záchvaty [44]. Ve vysokých dávkách může diazepam závažně ovlivnit motorické funkce a jeho opakované užívání může dokonce vyústit k rozvoji závislosti [45]. Také se objevily informace, že benzodiazepiny často nedokáží chránit před perzistentním záchvatovou aktivitou a neurodegenerací, ke kterým dochází v pozdějších fázích po expozici NPL. Z tohoto důvodu byly navrženy neurosteroidy jako širokospektré antikonvulzivní antidotum pro intoxikace NPL [43].

Třetí podávanou látkou je samotný reaktivátor AChE, obvykle oxim, který hydrolyzuje fosforylovaný enzym a obnovuje tak jeho funkci [21]. Reaktivace AChE je účinná u nikotinových i u muskarinových receptorů, ale oxim není schopen reaktivovat stárnoucí komplex, proto se použití reaktivátorů doporučuje již v ranné fázi léčby toxických účinků NPL, aby se zabránilo procesu stárnutí [29].

Správně a včasné poskytnutá první pomoc může zásadně ovlivnit další průběh intoxikace a samotnou záchranu života postiženého, bez podání adekvátních látek dochází k úmrtí během 20-30 minut. Poskytnutí první pomoci při intoxikaci NPL formou podání výše zmíněných antidot je řešeno pomocí tzv. autoinjektoru [46]. Pro armádní první pomoc je na trhu k dostání dvoukomorový autoinjektor Combopen obsahující atropin s obidoximem v kombinaci s autoinjektorem obsahující diazepam. Naproti tomu pro odbornou lékařskou první pomoc byl zaveden CHONOL (atropin) a CHONOL II (benaktyzin) jako tzv. anticholinergikum, chránící před centrálními účinky při intoxikaci NPL [46–49]. Do výzbroje armády ČR byl také zaveden autoinjektor GAI (atropin a obidoxim) a RENOL (methoxim). Proti vysoce účinným NPL, jako je např. soman, lze použít autoinjektor ANTIVA (HI-6) [49].

Katedra toxikologie a vojenské farmacie, fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany (dále jen KTOX FVZ UO) ve spolupráci s CHemProtect, a.s. a VAKOS XT a.s. připravila prototyp prvního tříkomorového autoinjektoru. První komora obsahuje pevnou formu HI-6 dimethansulfonátu, druhá komora je tvořena roztokem atropinu a v třetí je obsažen roztok diazepamu [50].

3.2 Reaktivátory acetylcholinesterasy

Spontánní hydrolyza fosforylovaného enzymu probíhá velmi pomalu, stejně jako syntéza AChE de novo [1]. Reaktivaci AChE, inhibované NPL, však můžeme urychlit konkrétními látkami zvanými reaktivátory. Současným standardem v léčbě při otravě NPL je kombinace těchto reaktivátorů s antagonisty muskarinových receptorů, které blokují jejich nadměrnou stimulaci a s antikonvulzivními léčivy tlumící tonicko-klonické křeče, jak už bylo výše zmíněno [51].

Jako reaktivátory se využívají sloučeniny, které obsahují ve své molekule funkční oximovou skupinu ($R-CH=NOH$) připojenou na kvartérní dusíkový pyridinový kruh. Existuje několik základních charakteristických strukturálních znaků souvisejících s účinností oximu a s jeho rychlostí reaktivace. Prvním z nich je přítomnost kvartérního dusíku v molekule reaktivátoru, který zajišťuje afinitu oximu k inhibované AChE [52]. Dalším důležitým charakteristickým prvkem je samotná přítomnost oximové skupiny, která při pH lidského plazmy (pH 7,4) částečně disociuje za vzniku oximátového anionu ($R-CH=NO^-$), který hraje zásadní roli při reaktivaci inhibované AChE. Zatímco počet funkčních oximových skupin v molekule reaktivátoru nijak zvlášť účinek reaktivace neovlivní, obvykle spíše zvýší jeho toxicitu, tak pozice oximové skupiny na pyridinovém kruhu je rozhodující pro reaktivační potenciál daného reaktivátoru [44, 53, 54]. Pokud je oximová skupina umístěná v pozici 3 pyridinového kruhu dosahuje vysoké hodnoty pK_a , což snižuje vznik oximátového anionu, a zároveň vytváří sférickou překážku molekule reaktivátoru. Kromě toho bylo zjištěno, že oximová skupina v pozici 2 je důležitá pro reaktivaci somanem inhibované AChE, zatímco oximová skupina v pozici 4 je lepší pro aktivaci tabunem inhibované AChE [55]. V případě reaktivátorů tvořených dvěma a více pyridinovými kruhy může mít významný vliv na jejich schopnosti reaktivovat inhibovanou AChE také délka a rigidita spojujícího řetězce (přídavek dvojně vazby nebo aromatického kruhu zbytku zvyšuje reaktivační účinnost = zdroj π -elektronů) [44, 56].

3.2.1 Rozdělení

Reaktivátory AChE lze rozdělit do skupin pomocí dvou kritérií. Jedním z nich je počet kvarterních dusíků v molekule. Reaktivátory tvořené pouze jedním kvartérním dusíkem nazýváme jako monokvartérní reaktivátory (nebo-li monopyridinové), reaktivátory se dvěma kvartérními dusíky označujeme jako biskvartérní reaktivátory (nebo-li bispyridinové) [57]. Druhým kritériem je přítomnost náboje, podle níž dělíme reaktivátory na nabitě a nenabitě reaktivátory [58].

3.2.1.1 Monokvartérní reaktivátory

V roce 1955 proběhla, Wilsonem a Ginsburgem, syntéza prvního monokvartérního reaktivátoru AChE tzv. pralidoximu (2-PAM). Stejný výzkum, vedoucí k syntéze 2-PAM a k rozpoznání jeho reaktivních vlastností, provedl nezávisle na Wilsonovi a Ginsburgovi i Albert Lawrence Green a Daniel Richard Davies v Británii [59, 60].

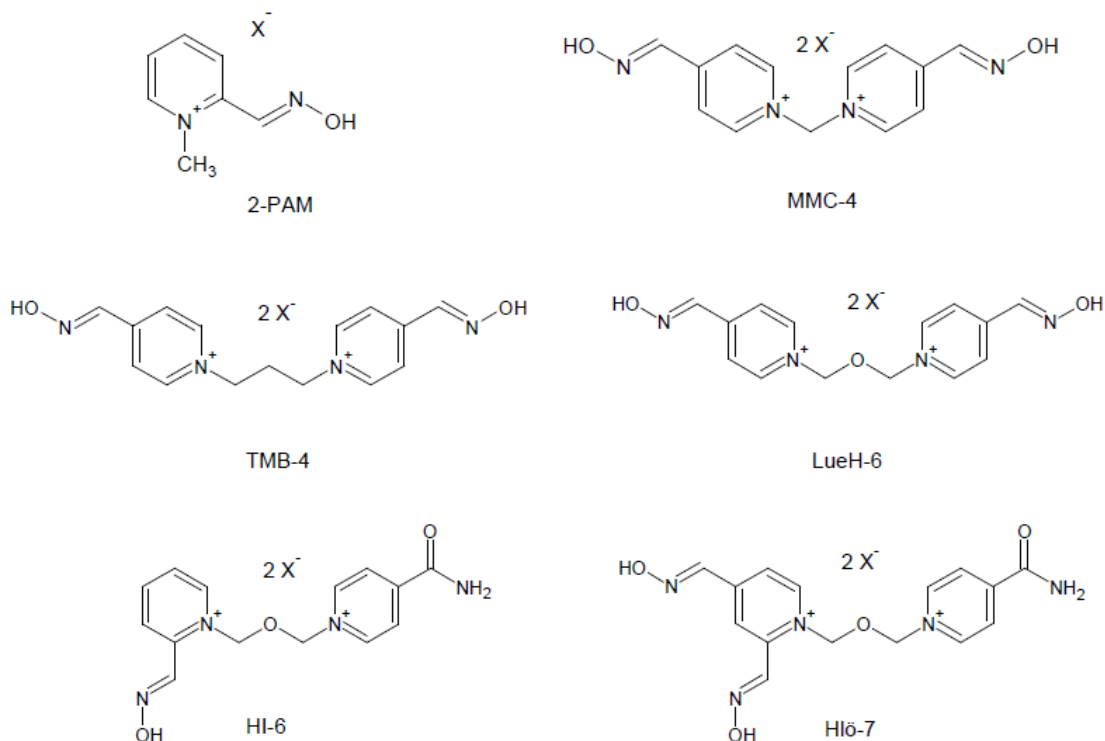
2-PAM se může vyskytovat ve formě několika solí, z nichž celosvětově nejvíce užívaným je pralidoxim chlorid, který bývá často označován jako tzv. zlatý standard mezi reaktivátory [46, 61]. Ačkoliv byl 2-PAM prvním klinicky významným reaktivátorem, je známý také jako nejméně účinný reaktivátor mezi komerčně dostupnými oximy [44]. Jeho účinnost reaktivovat tabunem, somanem nebo cyklosarinem inhibovanou AChE je velmi nízká [62]. Navíc kvůli omezenému prostupu přes HEB je jeho reaktivační účinek omezený převážně na periferní nervový systém. Předpokládá se, že hlavním terapeutickým účinkem pralidoximu je obnovení neuromuskulárního přenosu u nikotinových synapsí [61].

3.2.1.2 Bispyridinové reaktivátory

Ve srovnání s monokvartérními součeninami jsou biskvartérní reaktivátory, díky přítomnosti druhého kvartérního dusíku v molekule oximu, který zvyšuje jeho afinitu vůči inhibované AChE, účinnějšími antidoty [63]. Na druhou stranu vykazují menší lipofilitu než monokvartérní oximy, a proto špatně pronikají přes HEB do CNS. Udává se prostupnost pouze 6 % z celkového množství dodaného do organismu [64].

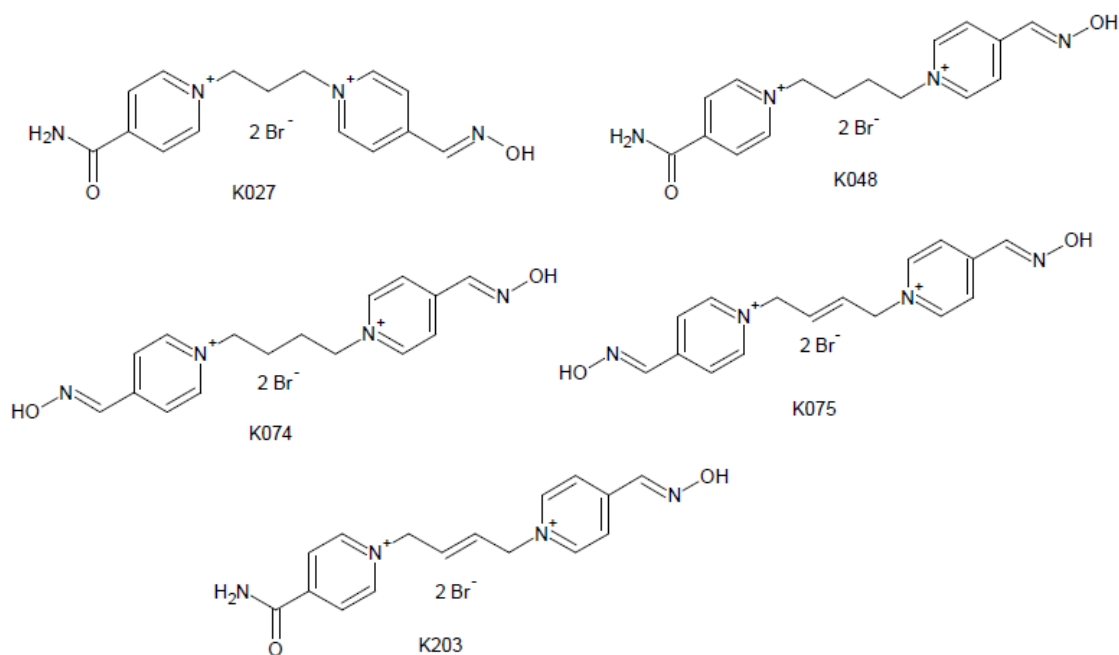
Bispyridinové reaktivátory byly vyvinuty následně po syntéze 2-PAM s cílem zlepšit jeho schopnost reaktivovat inhibovanou AChE. Jejich nesmírnou výhodou je schopnost interagovat se dvěma anionovými centry AChE [65]. Mezi hlavní zástupce, které vyobrazuje obrázek č. 2, patří methoxim (MMC-4), obidoxim (LueH-6), trimedoxim (TMB-4), asoxim (HI-6) a v neposlední řadě také HIö-7. MMC-4 byl

popsán poprvé v 60 letech 20. století a jeví se jako účinný reaktivátor v léčbě otrav sarinem, cyklosarinem a látkou VX, naopak jeho účinnost proti AChE inhibované somanem a tabunem je špatná [44, 46]. V případě reaktivace tabunem inhibované AChE je doposud nejúčinnějším antidotem TMB-4 [64]. Používá se ve formě autoinjektorů v některých východoevropských zemích a podává se v dávce 1000 mg i.m. [54]. Na základě TMB-4 byly syntetizovány další tzv. H-reaktivátory: HI-6 a HI-7 [63]. HI-6 je první látka, která je schopna reaktivovat somanem inhibovanou AChE, pokud je podána krátce po intoxikaci. Rovněž je účinný v léčbě otravy způsobené sarinem, cyklosarinem nebo látkou VX. Nedokáže však reaktivovat tabunem inhibovanou AChE, ale i přesto je v současnosti považován za reaktivátor s nejširším spektrem účinku a je tudíž lékem první volby při expozici NPL [42, 53]. HI-7 je strukturálním analogem HI-6, lišící se přítomností druhé oximové skupiny v poloze 4 pyridinového kruhu, která hraje důležitou úlohu při reaktivaci AChE inhibované NPL [54]. HI-7 je velmi účinným reaktivátorem AChE inhibované tabunem, somanem a sarinem. Poprvé byl syntetizován v roce 1986 Löfflerem [66]. Nevýhodou HI-7, a stejně tak i HI-6, je jejich špatná stabilita ve vodném roztoku, která znesnadňuje jejich skladování před možným klinickým použitím. Řešením tohoto problému je příprava stabilnějších solí [66].



Obrázek 2 Přehled nejvýznamnějších komerčně dostupných zástupců reaktivátorů AChE: 2-PAM (pralidoxim), MMC-4 (methoxim), TMB-4 (trimedoxim), LueH-6 (obidoxim), HI-6 (asoxim).

Na přelomu 20. a 21. století byla, na KTOX FVZ UO v Hradci Králové, syntetizována početná skupina bispyridinových reaktivátorů s označením „K“, která vedla k několika slibným sloučeninám, jejichž struktury jsou znázorněny na obrázku č. 3. První generaci K-oximů zastupují sloučeniny K027 a K048, které prokázaly výbornou reaktivační účinnost zejména proti pesticidním otravám a nižší toxicitu ve srovnání s jinými dostupnými sloučeninami [67]. Druhá generace K oximů je reprezentována oximy K074 a K075 prodlužující reaktivační účinnost LueH-6 a TMB-4, avšak nevýhodou těchto oximů je relativně vysoká toxicita. V roce 2007 byl vyroben oxim K-203 jako nejslibnější sloučenina z třetí generace K-oximů, jehož struktura je odvozena od reaktivátoru K027 a K075. Díky přítomnosti karbamoylové skupiny se oxim vyznačuje nízkou toxicitou [67, 68]. Výsledky ukazují, že akutní toxicita nově vyvinutého oximu K203 je o něco vyšší než akutní toxicita LueH-6 a TMB-4 u myši, ale je významně nižší než akutní toxicita LueH-6 a TMB-4 u potkanů [67]. Oxim K203 je schopen významně reaktivovat AChE inhibovanou tabunem v krvi i v CNS a je tak vhodným kandidátem pro zavedení do praxe [69].



Obrázek 3 Přehled vybraných K-oximů

3.2.2 Účinky

Mechanismus účinku reaktivátorů spočívá v obnovení normálního přenosu nervového vzruchu a je zprostředkován nukleofilní oximovou skupinou, ke které mají NPL, obecně organofosfáty, vyšší afinitu než k AChE. Samotná reaktivace probíhá ve dvou následujících krocích. Nejprve oxim napadá atom fosforu v komplexu inhibitor-enzym (tj. v komplexu NPL-AChE). Kovalentní vazba mezi NPL a serinem AChE je štěpena za vzniku reverzibilního komplexu. Druhý krok je realizován uvolněním fosfátové skupiny, navázané na oxim, z aktivního místa a obnovením katalytické aktivity AChE, která je schopna opět vázat a štěpit svůj substrát (ACh) [70].

Účinky reaktivátorů jsou však omezeny rychlostí stárnutí inhibovaného enzymu, která závisí na chemické struktuře NPL a na délce kontaktu s AChE [3]. Z tohoto hlediska jsou NPL, u kterých byla pozorována rychlá dealkylace, velmi nebezpečné, protože inhibovaná AChE se stává rezistentní vůči kauzální terapii zprostředkovanou reaktivátory. Nejrychlejší dealkylaci vykazuje inhibice somanem, řádově v několika minutách, poločas dealkylace sarinem inhibované AChE se pohybuje v rozmezí 10 hodin, a u inhibice AChE látkou VX byla pozorována dealkylace do 24 hodin [35, 36].

Struktura oximového reaktivátoru determinuje jeho schopnost úspěšně reaktivovat AChE. Doposud neexistuje žádný reaktivátor, který by dokázal spolehlivě obnovit aktivitu AChE inhibovanou všemi typy NPL [71].

3.2.3 Nové trendy

Nedávný výzkum, směřující k novým reaktivátorům, byl věnován převážně sloučeninám na bázi oximu, které měli za úkol překonat některé významné reaktivátory. V současné době používané oximy mají totiž několik nevýhod jako je relativně vysoká vnitřní toxicita, neschopnost, v důsledku trvalého náboje, pronikat přes HEB k reaktivaci AChE v CNS, a také neschopnost účinně reaktivovat všechny typy NPL způsobující inhibici AChE. Všechny tyto problémy byly a jsou řešeny výzkumnými laboratořemi po celém světě, doposud ale bylo dosaženo pouze omezeného úspěchu [71].

Jedním z hlavních řešení, jak docílit zvýšené permeability reaktivátoru přes HEB, je nalezení a syntéza tzv. neiontových oximových reaktivátorů, avšak zatím bylo zaznamenáno jen několik málo úspěšných pokusů [71].

Nenabité oximy vykazují, ve srovnání s jinými komerčně dostupnými reaktivátory vyšší lipofilitu, díky které jsou schopny překonat HEB. Na druhou stranu, jako lipofilní látky mají nízkou rozpustnost v hydrofilních roztocích, proto znesnadňují intramuskulární a intravenózní podání a v důsledku absence náboje je reaktivační účinnost jejich oximové skupiny značně snížena. Nicméně účinnost nenabitých oximových reaktivátorů lze zachovat např. substitucí jejich funkčních skupin [62, 71, 72]

Prvními nekvartérními reaktivátory, které se dostaly do povědomí především díky svoji schopnosti překonat HEB, byly monoisonitrosoaceton (MINA) a diacetylmonooxim (DAM). Ačkoliv MINA i DAM vykazují lepší distribuci do CNS, je jejich reaktivační účinnost ve srovnání s 2-PAM a dalšími kvartérními oximy nižší [73, 74]. Dalším příkladem reaktivátoru nesoucí nenabitou oximovou skupinu je proléčivo 2-PAM tzv. Pro-2-PAM, které se po překonání HEB oxiduje na účinný kvartérní oxim. I když se ukázal jako poměrně účinný reaktivátor somanem inhibované AChE u testovaných morčat, ve srovnání s běžně používaným 2-PAM je jeho použití limitováno obtížnou syntézou a omezenou stabilitou v důsledku autooxidace [75, 76].

Kalisiak a spol. navrhli skupinu reaktivátorů, obsahující kromě oximové skupiny také amidinový zbytek, podle kterého dostali tyto sloučeniny označení amidin-oximy. Amidinová skupina poskytuje této skupině reaktivátorů pseudopozitivní náboj, napodobující kvartérní centrum pyridinových oximů a zároveň také zvyšuje vazebnou afinitu k inhibované AChE [77–79]. In vivo studie ukazují schopnost amidin-oximů chránit mozek myši intoxikovaných sarinem a somanem [78, 80]. Mercey a spol. syntetizovali reaktivátory s oximovou skupinou navázanou na 6,7-dimethoxy-1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolinovém jádru, díky kterému se tyto sloučeniny váží do periferního místa inhibované AChE. Platí, že vazba do periferního místa významně zvyšuje vazbu reaktivátoru na inaktivovanou AChE [81].

Reaktivace AChE zprostředkovaná oximem je obecně limitována opětovnou inhibicí již reaktivované AChE zbytkovými NPL, které cirkulují v krevním řečišti. Řešením tohoto problému je koncepce tzv. bioscavengerů. Jedná se o molekuly, které jsou schopné zachytit nezreagované molekuly NPL v krvi a degradovat je. Díky tomu zabraňují, aby se NPL vázaly na centrální nebo periferní AChE [82, 83].

Novým trendem v oblasti reaktivace AChE v CNS je také využití nanočástic s navázanými oximy. Yang a spol. využili oxim HI-6 zachycený v nanočásticích oxidu křemičitého, aby obnovili centrální AChE u myši a zabránili tak poškození mozku vyvolaného sarinem [84].

Ačkoliv bylo syntetizováno několik slibných reaktivátorů schopných obnovit aktivitu AChE v mozku, žádný z nich nebyl dále rozvíjen. Důvodem byla často nízká reaktivační účinnost nebo výrazné toxicita [75]. Proto je snaha najít zcela novou alternativní třídu sloučenin, které by byly schopné reaktivovat inhibovanou AChE.

3.3 LD₅₀

LD₅₀ představuje dávku, která po jednorázovém podání usmrtí 50 % pokusných zvířat [85]. Obvykle se vyjadřuje v mg/kg tělesné hmotnosti a využívá se ke stanovení akutní toxicity a k vzájemnému porovnávání stupně toxicity sledovaných látek [86].

Hodnota LD₅₀ je značně variabilní a závislá na experimentálních podmínkách jako je pohlaví zvířat, jejich věk, druh a rod, popřípadě roční období, ve kterém byla zkouška provedena [86].

Zkouška by se měla provádět minimálně na dvou druzích zdravých dospělých zvířat, a to u obou pohlaví, přičemž myši a potkani jsou k tomuto účelu používány nejčastěji. Počet zvířat se obvykle v jedné pokusné skupině pohybuje v rozmezí 5 až 10. Volba způsobu podání závisí na vlastnostech testované látky i na účelu testování. V rutinních testech se používají tři způsoby podání, které stimulují tři nejběžnější cesty vstupu toxických látek do organismu: perorální, transdermální a inhalační podání. Pro testování toxicity léčiv se využívá injekčních způsobů aplikace: intravenózní (injekce do žíly), intramuskulární (injekce do svalu), intraperitoneální (injekce do břišní dutiny) a subkutánní (injekce pod kůži) [85]. Látka se skupině laboratorních zvířat aplikuje jednorázově s použitím několika rostoucích dávek, tak aby při nejnižší dávce uhynulo 10 % zvířat a při nejvyšší 90 % zvířat ve skupině. V průběhu testu se registruje počet uhynulých zvířat v závislosti na dávce testované látky. U zvířat, která přežila, se po dobu 14 dní sleduje zdravotní stav, zahrnující změnu chování a změny ve fyziologických funkcích, protože některé látky mohou působit až po poměrně dlouhé době latence. Po ukončení pokusu jsou všechna zvířata utracena a podrobena pitvě. Podle procenta uhynulých zvířat ve vztahu k dávce se vypočte LD₅₀ [85, 86]. Extrapolace výsledků hodnot LD₅₀ ze zvířat na člověka má jen omezenou platnost [87].

Následující tabulka č. 6 klasifikuje toxické látky podle velikosti LD₅₀.

chemická látka	LD ₅₀
Supertoxická	5 mg.kg ⁻¹ a méně
extrémně toxická	5-50 mg.kg ⁻¹
vysoce toxická	50-500 mg.kg ⁻¹
středně toxická	0,5-5 g.kg ⁻¹
málo toxická	5-15 g.kg ⁻¹

Tabulka 6 Klasifikace toxických látek podle LD₅₀

Zdroj: [3]

3.4 MTD

Maximální tolerovaná dávka je lékopisem stanovena jako dávka, která ještě nevyvolá toxické příznaky [87]. Volí se na základě výsledků subchronického experimentu, který slouží ke zjištění dávkové závislosti při opakované expozici škodlivými látkami [85].

V subchronickém testování se pracuje s 10 až 20 zvířaty obou pohlaví pro každou dávkovou hladinu, přičemž v praxi se využívá min. tři dávkovacích hladin a jedna skupina zvířat, tzv. kontrolní skupina, zůstává neexponovaná. V případě, že se experimentální látka podává testovací skupině zvířat v nějakém rozpouštědle, je důležité, aby kontrolní skupině bylo toto rozpouštědlo rovněž podáno, ovšem bez rozpuštěné testované látky. Během experimentu se zvířatům, a to kontrolní i testovací skupině, měří zvolené biochemické parametry, např. parametry krevního obrazu, aktivita enzymů v plazmě či v séru, DNA adukty aj. Po skončení pokusu se všechna zvířata utratí a histopatologicky se vyšetří. Výsledkem subchronických zkoušek jsou hodnoty NOAEL (nejvyšší dávka léčiva, při které nebyl pozorován toxický účinek) a LOAEL (nejnižší dávka léčiva, při které byl pozorován toxický účinek) [85].

4 Cíl

Cílem této práce je srovnání účinnosti reaktivace standardního reaktivátoru HI-6 ve dvou různých dávkách (5 % LD₅₀ a 100 % MTD) po intramuskulárním podání jedné LD₅₀ sarinu laboratorní myši Balb/C na základě naměřené aktivity AChE v krvi a v mozku.

5 Experimentální část

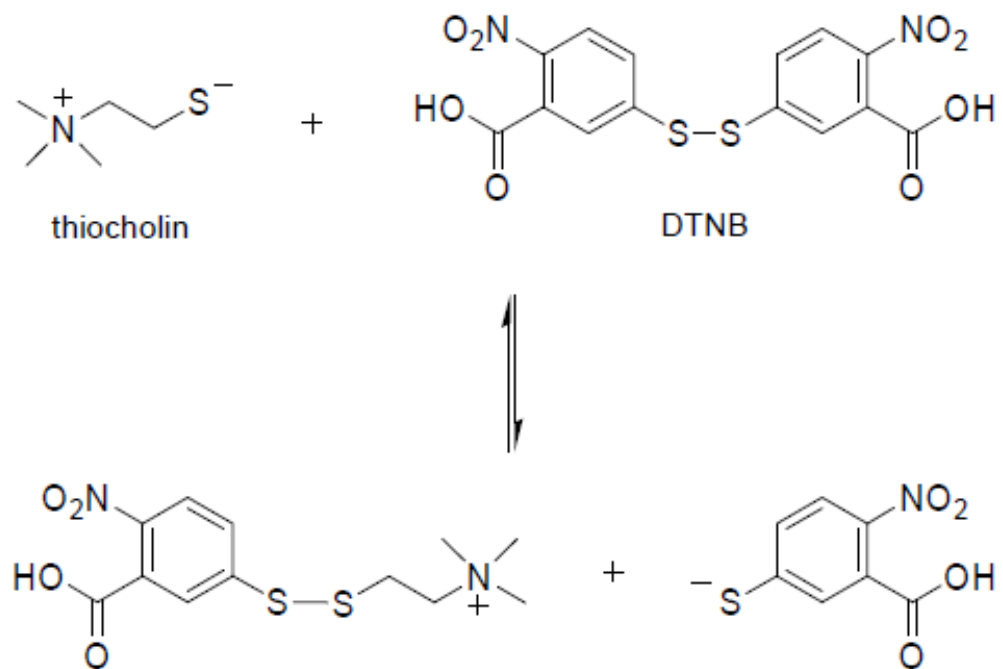
5.1 Princip metody

Ke stanovení aktivity AChE byla použita standardní Ellmanova metoda modifikovaná dle Bajgara. Princip této metody spočívá v hydrolyze acetylthiocholinu za vzniku kyseliny octové a thiocholinu, který následně reaguje s přidavkem 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Během této interakce dochází k rozštěpení sulfidického můstku v molekule DTNB a k vazbě thiocholinu na jednu vzniklou SH- (thiolovou) skupinu za současného uvolnění 5-thio-2-nitrobenzoového aniontu (TNB⁻). Vzniklý TNB⁻, podléhající konjugaci dvojných vazeb, je v posledním kroku detekován spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm pro mozek, a při 436 nm pro krev, tak aby nedocházelo k výrazným interferencím s hemoglobinem [88, 89]. Následující obrázky č. 4, 5 a 6 schematicky znázorňují princip Ellmanovy metody.



Obrázek 4 Rozštěpení acetylthiocholinu AChE na kyselinu octovou a thiocholin.

Zdroj: [88]



Obrázek 5 Rozštěpení S-S můstku a vazba thiocholinu na DTNB.

Zdroj: [88]



Obrázek 6 Konjugace dvojných vazeb kyseliny 2-merkaptto-2-nitrobenzoové.

Zdroj: [88]

5.2 Příprava základních roztoků

5.2.1 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB)

0,1 g DTNB bylo rozpuštěno ve 100,0 ml 0,1 M Tris pufru. Roztok DTNB je na světle nestálý, a proto byl připravený vždy v čase potřeby a během pokusu byl uchováván ve skleněné baňce obalené alobalem.

5.2.2 Acetylthiocholin jodid (ATChJ)

0,029 g ATChJ bylo rozpuštěno v 10,0 ml destilované vody, čímž vznikl zásobní roztok ATChJ, který byl následně rozpipetován po 1 ml do ependorfek a uchováván v mrazáku při teplotě -12°C . Rozmražený 1,0 ml 10,0 mmol ATChJ byl naředěný do 10,0 ml destilovanou vodou.

5.2.3 Tris 0,1 M

Zásobní roztok Tris 0,1 M byl připraven rozpuštěním 24,2 g 1,1,1-tris-hydroxymethyl-aminomethanu, přibližně, v 900,0 ml destilované vody. Pomocí pH metru bylo nejprve zkontrolováno pH vzniklého roztoku a následně bylo toto pH upraveno pomocí přídavku kyseliny chlorovodíkové (HCl) na hodnotu 7,6. Objem roztoku byl doplněn destilovanou vodou na objem 1000,0 ml a skladován ve skleněné láhvi při teplotě 4°C .

5.2.4 Tris 0,02 M

Zásobní roztok Tris 0,02 M byl připraven zředěním roztoku Tris 0,1 M. 100,0 ml 0,1 M Tris pufru bylo doplněno do 450,0 ml destilovanou vodou. Pomocí pH metru bylo změřeno a upraveno pH roztoku na 7,6 a roztok byl doplněn destilovanou vodou do 500,0 ml.

5.2.5 Cystein chlorid

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 0,03152 g cystein chloridu ve 200,0 ml destilované vody.

5.3 Chemikálie

Sarin o čistotě 94 % byl získán z Vojenského technického ústavu v Brně. Zásobní roztok sarinu (1mg/ml) byl připraven v 1,2-propandiolu. Látka HI-6 byla syntetizována na katedře toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví a její čistota, stanovená pomocí HPLC techniky s UV detekcí, byla 97 %. Všechny ostatní chemikálie byly získány komerčně od firmy Sigma-Aldrich, USA.

5.4 Přístroje a pomůcky

Zkumavky Safe-Lock (Eppendorf)

Špičky (Brand Wertheim)

Pipeta krokovací Handy Step electronic (Brand Wertheim)

Vortex Lab Dancer (IKA Staufen, Germany)

Váhy (Mettler Toledo, USA)

Spektrofotometr Helios Alpha (ThermoFisher Scientific, USA)

Homogenizátor DI-25 Basic (IKA Werke, Německo)

Microsoft Excel software (Redmont, WA, USA)

GraphPad Prism verze 6 pro Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

5.5 Zvířata

Experiment byl prováděn na myších BALB/c (6 až 8 týdnů; 21 až 25 g tělesné hmotnosti) zakoupených u firmy Velaz (Praha, Česká republika). Zvířata byla chována v prostředí řízeného hospodářství s přístupem ke standardní stravě pro hlodavce (Cerea Corp., Praha) a vody ad libitum. Myši byly rozděleny do 10 experimentálních skupin po 6 zvířatech (viz tabulka č. 7). Doba aklimatizace před experimentálními postupy byla nejméně 10 dnů a všechny sloučeniny byly podávány i.m. ve standardizovaném objemu 1 ml/kg. Využití zvířat bylo schváleno Etickou komisí Fakulty vojenského zdravotnictví ČR. Personál manipulující s pokusnými zvířaty získal osvědčení o způsobilosti pracovat s laboratorními zvířaty podle § 17odst. 1 zákona č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

5.6 Průběh experimentu

Nejprve byla hodnocena akutní toxicita reaktivátoru HI-6 stanovením MTD u myši, které byly náhodně rozděleny do experimentálních skupin složených ze dvou samců a dvou samic. Myšim byla i.m. aplikována dávka reaktivátoru HI-6. Tyto myši byly pozorovány na projevy toxicity během prvních dvou hodin a poté pravidelně po 48 hodinách. Pozorované symptomy jako třes, slinění, polehávání zvířete byly zaznamenány. Následně byla určena hodnota MTD. Všechna zvířata, která přežila 48 hodin, byla usmrcena pomocí CO₂ a podrobena základní makroskopické nekropsii.

Po stanovení MTD byla posuzována účinnost reaktivace oximu HI-6 sarinem inhibované AChE. Myši byly rozděleny do 10 experimentálních skupin, které znázorňuje následující tabulka č.7. HI-6 byla podávána buď ve stanovené dávce 100 % MTD (160 mg/kg) nebo v dávce 5 % LD₅₀ (33,5 mg/kg) a to samostatně nebo v kombinaci s atropinem 1 minutu po intoxikaci sarinem. Myši byly eutanázovány CO₂ po 60 minutách od aplikace látek a z usmrcených zvířat byla punkcí srdce odebrána srážlivá krev do jednorázové plastové ependorfky, obsahující heparin, a následně byl odebrán i mozek pro stanovení aktivity AChE.

Tabulka 7 Rozdělení myši Balb/c do experimentálních skupin.

skupina	látka
1	fyziologický roztok
2	fyziologický roztok + atropin
3	sarin
4	sarin + atropin
5	HI-6 100 % MTD
6	HI-6 5 % LD ₅₀
7	sarin + HI-6 100 % MTD
8	sarin + HI-6 5 % LD ₅₀
9	sarin + atropin + HI-6 100 % MTD
10	sarin + atropin + HI-6 5 % LD ₅₀

LD₅₀ střední smrtná dávka, MTD maximální tolerovaná dávka

5.7 Sestrojení kalibrační závislosti

Abychom eliminovali nepřesnosti, které mohou vzniknout v preanalytické části, a mohli tak zajistit maximální přesnost daného měření, bylo potřeba, před zahájením samotného měření aktivity AChE, provést kalibraci přístroje.

Kalibrační roztoky byly připraveny postupným ředěním zásobního roztoku cysteinu podle následujícího postupu:

- 995 μl H_2O + 5 μl cysteinu,
- 500 μl H_2O + 500 μl z předchozí ependorfky,
- 500 μl H_2O + 500 μl z předchozí ependorfky,
- 500 μl H_2O + 500 μl z předchozí ependorfky.

Všechny kalibrační roztoky byly řádně promíchány.

Pro vykreslení bodu [0,0] na grafu kalibrační závislosti bylo do dvou kyvet napipetováno 1,7 ml roztoku DTNB a 300 μl vody. Obsah kyvet byl promíchán a kyvety byly následně vloženy do spektrofotometru, kde byla měřena jejich hodnota absorbance při vlnové délce 436 nm. Další body na kalibrační křivce byly získány měřením směsi, obsahující 1,7 ml DTNB, 100 μl vody a 200 μl daného kalibračního roztoku cysteinu, za stejných výchozích podmínek.

Všechny body kalibrační závislosti byly měřeny dvakrát a v grafech byly vyneseny průměrné hodnoty změřených absorbancí odpovídající jednotlivým koncentracím kalibrační řady cysteinu. Výsledná kalibrační přímka byla postupně sestrojena spektrofotometrem během měření kalibračních roztoků cysteinu.

5.8 Postup stanovení aktivity inhibitorů AChE

5.8.1 V krvi

Odebraný vzorek heparinizované krve byl nejprve promíchán a do zkumavky s obsahem 1,9 ml Tris 0,02 M z něj bylo odebráno 100 μ l. Zkumavka se nechala stát, dokud nedošlo k mírnému projasnění, způsobeného hemolýzou červených krvinek. Poté bylo do kyvety napipetováno 1,7 ml DTNB, 100 μ l připraveného hemolyzátu a celá reakce byla odstartována přidáním 200 μ l ATCh. Obsah kyvety byl promíchán a kyveta byla vložena do spektrofotometru, kde byla změřena příslušná absorbance při vlnové délce 436 nm po dobu 5 minut (4 minuty stání, 1 minuta měření). Každý vzorek byl měřen dvakrát za stálé laboratorní teploty (25 °C).

5.8.2 V mozku

Usmrceným zvířatům byly kompletně odebrány mozky, které se umístily na Petriho misky na základě skupinového rozdělení (viz. tabulka č.7). Vzorky byly následně uchovávány při teplotě -20 °C.

V den měření byla nejprve určena hmotnost daného mozku. Vzorek byl v poměru 1:9 naředěn 0,02 M Tris pufrem a poté bylo vše pomocí homogenizátoru homogenizováno. Dále se postupovalo stejně jako u krve, do kyvety bylo napipetováno 1,7 ml DTNB, 100 μ l připraveného homogenizátu a 200 μ l ATCh. Kyveta byla promíchána a vložena do spektrofotometru, kde se změřila příslušná absorbance při vlnové délce 412 nm po dobu 3 minut (2 minuty stání, 1 minuta měření). Opět byl každý vzorek měřen dvakrát.

6 Výsledky

6.1 Zpracování experimentálních dat

Aktivita AChE, vyjádřená jako $\mu\text{kat/L}$ nebo $\mu\text{kat/kg}$, byla odvozena od hodnoty absorbance získané pomocí kalibrační křivky, která byla zhotovená pomocí kalibračních roztoků cysteinu. Kontrolní hodnota aktivity AChE byla získána od myši, kterým byl podáván pouze fyziologický roztok. Procento reaktivace bylo vypočteno z hodnot aktivity AChE pomocí následujícího vzorce.

$$\% R = \left(1 - \frac{V_0 - V_r}{V_0 - V_i} \right) * 100$$

Rovnice 1 Výpočet procenta reaktivace inhibované AChE.

V_0 původní vzorek (kontrola)

V_r reaktivovaný vzorek

V_i inhibovaný vzorek (sarin)

Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny jednosměrným testem ANOVA na úrovni spolehlivosti $P \leq 0,05$. Ke zpracování dat byl použit software Microsoft Excel (Redmont, WA, USA) a GraphPad Prism verze 6 pro Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

6.2 Experimentální data

S využitím Ellmanovy metody byla testována účinnost reaktivace standardního reaktivátoru HI-6 ve dvou různých dávkách – 5 % LD₅₀ a 100 % MTD. Následující tabulky (tabulka č.8 a tabulka č. 9) ukazují aktivity AChE v krvi a v mozku. Z výsledků vyplývá, že obě podané dávky byly schopné významně reaktivovat sarinem inhibovanou AChE v krvi i v mozku, přičemž v plazmě nebyl mezi oběma dávkami patrný významný rozdíl v účinnosti reaktivace. Naproti tomu v mozku byla reaktivační účinnost dávky 100 % MTD téměř třikrát vyšší v porovnání s běžně používanou dávkou 5 % LD₅₀.

Tabulka 8 Aktivita AChE v krvi.

léčba	aktivita AChE (μ kat/L nebo μ kat/kg)	známky intoxikace
fyziologický roztok	22,5 \pm 2,9	žádné
fyziologický roztok + atropin	24,5 \pm 1,9	žádné
sarin	2,55 \pm 1,41	+++
sarin + atropin	3,54 \pm 0,75	++
HI-6 100 % MTD	26,8 \pm 3,2	+
HI-6 5 % LD ₅₀	26,8 \pm 2,8	žádné
sarin + HI-6 100 % MTD	27,1 \pm 1,3 [§]	++
sarin + HI-6 5 % LD ₅₀	25,5 \pm 2,3 [§]	+++
sarin + atropin + HI-6 100 % MTD	27,4 \pm 2,3*	žádné
sarin + atropin + HI-6 5 % LD ₅₀	25,5 \pm 2,3*	+

Kde: Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm SD.

LD₅₀ střední smrtná dávka

MTD maximální tolerovaná dávka

+++ pasivní chování, tonické/klonické křeče, slzení, slinění

++ pomalá reakce, spontánní vokalizace, hypo/hyper ventilace, těžký třes

+ přerušovaný třes, rychlejší nebo pomalejší ventilace

[§]jednosměrná ANOVA vs. fyziologický roztok + sarin ($P < 0,05$)

*jednosměrná ANOVA vs. fyziologický roztok + sarin a atropin ($P < 0,05$)

Tabulka 9 Aktivita AChE v mozku.

léčba	aktivita AChE (μ kat/L nebo μ kat/kg)	známky intoxikace
fyziologický roztok	98,2 \pm 2,9	žádné
fyziologický roztok + atropin	97,5 \pm 4,2	žádné
sarin	14,0 \pm 1,7	+++
sarin + atropin	12,1 \pm 2,4	++
HI-6 100 % MTD	100 \pm 2	+
HI-6 5 % LD ₅₀	96,3 \pm 3,1	žádné
sarin + HI-6 100 % MTD	75,3 \pm 7,8 [§]	++
sarin + HI-6 5 % LD ₅₀	35,0 \pm 5,1 [§]	+++
sarin + atropin + HI-6 100 % MTD	74,9 \pm 4,2 ^{*#}	žádné
sarin + atropin + HI-6 5 % LD ₅₀	33,2 \pm 5,1 [*]	+

Kde: Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm SD.

LD₅₀ střední smrtná dávka

MTD maximální tolerovaná dávka

+++ pasivní chování, tonické/klonické křeče, slzení, slinění

++ pomalá reakce, spontánní vokalizace, hypo/hyper ventilace, těžký třes

+ přerušovaný třes, rychlejší nebo pomalejší ventilace

[§]jednosměrná ANOVA vs. fyziologický roztok + sarin ($P < 0,05$)

^{*}jednosměrná ANOVA vs. fyziologický roztok + sarin a atropin ($P < 0,05$)

[°]jednosměrná ANOVA vs. sarin + HI-6 5 % LD₅₀

[#]jednosměrná ANOVA vs. sarin + atropine + HI-6 5 % LD₅₀

7 Diskuse

NPL mohou způsobit, v důsledku nadměrné stimulace cholinergních receptorů, nevratnou blokádu AChE a v závislosti na dávce, tak mohou zapříčinit závažné poškození CNS následované smrtí intoxikovaného organismu. Úmyslné použití NPL proti civilnímu obyvatelstvu proto představuje významnou zdravotní hrozbu, což také potvrzují nedávné útoky na nevlastního bratra severokorejského vůdce Kim Čong-una nebo na ruského špiona Sergeje Skripala [18, 19]. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny látky, obecně řečeno oximy, které jsou schopné inhibici AChE zvrátit a eliminovat toxické příznaky.

Je známo, že kvartérní oximy mohou indukovat cholinergní toxické příznaky jako jsou např. slinění, dušnost nebo záškuby [90]. Ve větší koncentraci mohou zapříčinit také smrt intoxikovaného organismu, proto je posouzení bezpečnosti nově vyvinutých reaktivátorů velmi důležité pro jeho další preklinický a klinický vývoj.

Akutní toxicita dané sloučeniny je obvykle vyjádřena jako dávka LD_{50} a z tohoto parametru bývá následně často odvozená dávka terapeutická (často užívané hodnoty jsou 5 % LD_{50} nebo 20 % LD_{50}). Poslední dobou je však snaha nahradit hodnoty LD_{50} jinými parametry akutní toxicity. Důvodů, proč tomu tak je, je spousta. V první řadě je snaha podpořit zásadu 3R (z angl. restriction, replacement, refinement) pro etičtější použití zvířat při jejich testování. Cílem je nahradit metody využívající zvířata ve výzkumu, snížit počet využívaných zvířat a využívat metody, které zmírňují nebo minimalizují potencionální bolest a utrpení zvířete. Dalším důvodem je fakt, že běžně užívaný parametr LD_{50} by mohl výrazně podcenit terapeutickou dávku vzhledem k sigmoidální povaze křivky dávka – odezva. Z výše zmíněných důvodů byl zaveden parametr MTD jako neletální metoda, která připouští mírné až středně toxické účinky, ale zároveň snižuje počet testovaných zvířat.

Cíl této práce byl zaměřen na pozorování schopnosti dvou různých dávek rutinně užívaného oximu HI-6 (100 % MTD -160 mg/kg a 5 % LD_{50} – 33,5 mg/kg) reaktivovat sarinem inhibovanou AChE v krvi a v mozku u BALB/c outbredních myší. Oxim HI-6 je dobře známým reaktivátorem, který prokázal život zachraňující účinek [91]. Představuje reaktivátor s nejširším spektrem účinku a s nejvyšší reaktivační účinností ze všech doposud nasyntetizovaných sloučenin Avšak i přes jeho široké spektrum využití není schopen reaktivovat AChE inhibovanou tabunem a organofosfátovými

pesticidy [92]. Důvodem vysoké terapeutické účinnosti HI-6 je také, kromě úspěšné reaktivace somanem inhibované AChE, jeho přímý antimuskarinový a antinikotinový účinek, kterým eliminuje nadměrnou stimulaci cholinergních receptorů [93].

V mnoha experimentech *in vivo* se reaktivátory aplikují v dávce LD₅₀, a to nejčastěji ve frakcích 5 % LD₅₀ nebo 20 % LD₅₀ [94, 95]. Zatímco v této práci bylo zkoumáno, zda by zvýšení dávky oximu, použitím dávky 100 % MTD, mohlo vést k lepším výsledkům reaktivace AChE a ke snížení známek intoxikace. Také byla ověřena aktuální koncentrace oximu HI-6 ve zvířecí plazmě a mozku po aplikaci dvou různých dávek 100 % MTD (160 mg/kg) a 5 % LD₅₀ (33,5 mg/kg). Po *i.m.* podávání 160 mg/kg HI-6, dosáhla koncentrace v plazmě ~ 500 uM/ml za 20 minut a 10x nižší koncentrace za 60 minut. U myšního mozku dosáhla koncentrace 12 uM/kg za 20 minut a snížila se na 25 % při 60 minutách. Za časový interval, kdy by koncentrace HI-6 měla dosáhnout maxima, podle předchozích výsledků, byl stanoven časový úsek 20 minut [74]. Získané výsledky ukázaly, že permeace oximu HI-6 přes HEB je při této dávce přibližně 2 %, zatímco Karasová a spol. uváděli pouze 0,7 % HI-6 v mozku krysy po podání 39 mg/kg [96]. Vyšší koncentrace v CNS je následována i vyšší reaktivací AChE. Výše zmíněné výsledky, týkající se hladin HI-6 v plazmě a v mozku, budou teprve publikovány ve studii pod záštitou KTOX FVZ UO. Studie bude zpracována skupinou Hepnarová a spol.

Obě aplikované dávky byly schopné významně reaktivovat sarinem inhibovanou AChE v krvi i v mozku. Podle očekávání, byla reaktivační účinnost oximu HI-6 vyšší v plazmě, kde obě dávky zcela obnovily aktivitu sarinem inhibované AChE. V plazmě nebyl signifikantní rozdíl v účinnosti reaktivace mezi dávkami 5 % LD₅₀ a 100 % MTD. Naopak v mozku byl rozdíl v aktivitě AChE mezi skupinou léčenou 100 % MTD a 5 % LD₅₀ téměř 50 %. Získaná data jsou uvedena v tabulkách č. 8. a č. 9.

Kromě toho byly mezi jednotlivými experimentálními skupinami pozorovány významné rozdíly ve známkách intoxikace. Zvířata v obou kontrolních skupinách (fyziologický roztok/ fyziologický roztok + atropin) a zvířata, která dostávala 5 % LD₅₀ HI-6, nevykazovala žádné známky intoxikace. Naopak skupina, které byl aplikován oxim HI-6 v dávce 100 % MTD vykazovala mírný toxický účinek. Nejzávažnější známky intoxikace byly zjištěny (kromě kontrolní skupiny se sarinem) ve skupině léčené pouze 5 % LD₅₀ HI-6. Zajímavé je, že sarinová skupina léčená atropinem

vykazovala pouze snížené známky intoxikace. Myši léčené atropinem a 5 % LD₅₀ HI-6 vykazovaly přerušovaný třes, zatímco u skupiny léčené atropinem a 100 % MTD HI-6 zcela zmizely cholinergní známky intoxikace. Sarinová skupina léčená 100 % MTD HI-6, ale bez atropinu, byla charakterizována těžkými třesy, pomalou reakcí a spontánní vokalizací. Z výsledků je tedy patrné, že pro získání vyšší účinnosti léčby sarinem intoxikovaného organismu, je zapotřebí použít vyšší dávky oximu HI-6. Na druhé straně, pro snížení známek intoxikace je nezbytná kombinace daného oximu s atropinem, díky kterému jsou udrženy základní životní funkce.

Doposud nebyla publikována žádná studie podobného designu, která by rovněž přistupovala k reaktivátoru jako k jakémukoliv jinému léčivu a zkoumala jeho MTD ve srovnání s LD₅₀. Z tohoto důvodu není možné získané výsledky porovnat s žádným dalším komerčně dostupným reaktivátorem. V současnosti však na KTOX FVZ UO v Hradci Králové probíhá studie zaměřená na zkoumání účinnosti i dalších známých oximů (LueH-4 a TMD-4) v dávkách 100 % MTD a 5 % LD₅₀.

K dostání jsou ale data, která umožňují alespoň orientačně porovnat reaktivační účinek oximu HI-6 s jiným standardním reaktivátorem. Kassa a spol. ve své studii srovnává účinnost reaktivace sarinem inhibované AChE *in vivo* u vybraných bispyrimidinových oximů, včetně oximu HI-6. Mezi aplikovanými reaktivátory byl rovněž LueH-4, podaný v dávce 5 % LD₅₀, který je v kombinaci s atropinem jeden z nejúčinnějších oximů k léčbě intoxikací způsobených organofosfátovými pesticidy [97]. Výsledkem studie bylo zvýšení aktivity sarinem inhibované AChE v mozku o rovných 4,6 %, naproti tomu dávka 5 % LD₅₀ HI-6, demonstrována v tomto experimentu, byla schopna zvýšit aktivitu sarinem inhibované AChE v CNS o téměř 25 %. Na druhou stranu, výsledky reaktivace sarinem inhibované AChE u 5 % LD₅₀ LueH-4 a 5 % LD₅₀ HI-6 v krvi nemohou být vzájemně porovnány. Důvodem je vyšší aktivita AChE naměřená u skupiny zvířat tohoto pokusu, kterým byl podán HI-6 v dávce 5 % LD₅₀ s atropinem, než aktivita AChE kontrolní skupiny (fyziologický roztok). Proto nemůže být vypočteno procento reaktivace pro tuto skupinu, a tudíž nelze procenta reaktivace AChE po podání LueH-4 a HI-6 mezi sebou porovnat, jak tomu bylo u mozku. Vysvětlením, proč tomu tak je, může být fakt, že zvíře je živý materiál a občas reaguje jinak, než se předpokládá. Zatímco v této diplomové práci připadá na jednu experimentální skupinu 6 zvířat, Kassa a spol. pracoval s větším počtem zvířat, aby se těmto odchylkám vyvaroval [94]. Pokud se tedy vezme v potaz reaktivační

účinnost obou zmíněných reaktivátorů pouze v mozku, lze oxim HI-6 považovat za silnější reaktivátor sarinem inhibované AChE než LueH-4. Tento fakt také potvrzuje studie z roku 2015, zabývající se srovnáním reaktivační účinnosti K-oximů s reaktivátory LueH-4 a HI-6 [98].

Pro léčbu NPL intoxikací hraje podstatnou roli správné a včasné podání příslušného reaktivátoru, stejně tak jako dávka, ve které je reaktivátor do těla aplikován. Vyšší dávky těchto sloučenin mohou totiž negativně působit na PNS i CNS a způsobit tak závažné vedlejší účinky léčby. Snahou mnoha vědeckých laboratoří je najít takovou sloučeninu, která bude úspěšně reaktivovat všemi typy NPL inhibovanou AChE a zároveň nebude pro člověka vykazovat vysoký toxický účinek.

8 Závěr

Tato diplomová práce demonstruje experiment, jehož cílem je porovnání účinků standardního reaktivátoru HI-6 v dávce 100 % MTD a v dávce 5 % LD₅₀.

Obě dávky oximu HI-6 byly schopné reaktivovat inhibovanou AChE v krvi i v mozku. Zatímco v krvi nebyl příliš výrazný rozdíl v účinnosti reaktivace mezi oběma dávkami, tak v mozku byl rozdíl v aktivitě AChE mezi skupinou léčenou 100 % MTD a 5 % LD₅₀ téměř 50 %. Z výsledků je proto patrné, že pro získání vyšší reaktivační účinnosti je zapotřebí aplikovat vyšší dávky oximu HI-6.

V některých experimentálních skupinách byl zcela vyloučen atropin, aby se zjistil vliv HI-6 při vyšších dávkách na cholinergní receptory *in vivo*. Skupiny zvířat, kterým byl aplikován atropin v kombinaci s dávkou 100 % MTD nebo 5 % LD₅₀ HI-6 vykazovaly daleko lepší ochranu před intoxikací sarinem než skupiny, kterým byl podán samotný HI-6 bez ohledu na jeho dávku. Pro snížení známek intoxikace a pro samotné přežití je tedy nezbytné kombinovat příslušný oxim s atropinem.

9 Seznam rovnic

ROVNICE 1 VÝPOČET PROCENTA REAKTIVACE INHIBVANÉ ACHE. - 40 -

10 Seznam tabulek

TABULKA 1 PŘEHLED ZÁKLADNÍCH INFORMACÍ O TABUNU.....	- 14 -
TABULKA 2 PŘEHLED ZÁKLADNÍCH INFORMACÍ O SARINU.	- 14 -
TABULKA 3 PŘEHLED ZÁKLADNÍCH INFORMACÍ O SOMANU.	- 15 -
TABULKA 4 PŘEHLED ZÁKLADNÍCH INFORMACÍ O CYKLOSINU.	- 15 -
TABULKA 5 PŘEHLED ZÁKLADNÍCH INFORMACÍ O VX.....	- 16 -
TABULKA 6 KLASIFIKACE TOXICKÝCH LÁTEK PODLE LD ₅₀	- 31 -
TABULKA 7 ROZDĚLENÍ MYŠÍ BALB/C DO EXPERIMENTÁLNÍCH SKUPIN.....	- 37 -
TABULKA 8 AKTIVITA ACHE V KRVÍ.	- 41 -
TABULKA 9 AKTIVITA ACHE V MOZKU.	- 42 -

11 Seznam obrázků

OBRÁZEK 1 MECHANISMUS ÚČINKU NPL	- 19 -
OBRÁZEK 2 PŘEHLED NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH KOMERČNĚ DOSTUPNÝCH ZÁSTUPCŮ REAKTIVÁTORŮ ACHE: 2-PAM (PRALIDOXIM), MMC-4 (METHOXIM), TMB-4 (TRIMEDOXIM), LUEH-6 (OBIDOXIM),	- 25 -
OBRÁZEK 3 PŘEHLED VYBRANÝCH K-OXIMŮ	- 26 -
OBRÁZEK 4 ROZŠTĚPENÍ ACETYLTHIOCHOLINU ACHE NA KYSELINU OCTOVOU A THIOCHOLIN.	- 33 -
OBRÁZEK 5 ROZŠTĚPENÍ S-S MŮSTKU A VAZBA THIOCHOLINU NA DTNB.....	- 34 -
OBRÁZEK 6 KONJUGACE DVOJNÝCH VAZEB KYSELINY 2-MERKAPTO-2- NITROBENZOOVÉ	- 34 -

12 Bibliografie

- [1] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1356-4.
- [2] FILIPEC, Ondřej. *Úvod do problematiky zbraní hromadného ničení*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. ISBN 978-80-244-3810-8.
- [3] PATOČKA, Jiří. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada, 2004. ISBN 978-80-247-0608-5.
- [4] KASSA, Jiří. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* [online]. 2002, **40**(6), 803–816 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0731-3810. Dostupné z: doi:10.1081/CLT-120015840
- [5] PETROIANU, Georg A. The history of cholinesterase inhibitors: who was Maschnin(e)? [online]. 2008, (4), 325–327 [vid. 2019-03-19]. ISSN 0031-7144. Dostupné z: doi:10.1691/ph.2008.7275
- [6] KLEMENT, Cyril. *Mimoriadne udalosti vo verejnom zdravotníctve*. 1. vyd. Banská Bystrica: PRO, 2011. ISBN 978-80-89057-29-0.
- [7] PITSCHMANN, Vladimír. *Detekční trubičky: analýza vojensky významných toxických látek*. Beroun: Econt Consulting, 2003. ISBN 978-80-86664-01-9.
- [8] BAJGAR, Jiří. *Používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu: od historie k současnosti*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2006. ISBN 978-80-86225-75-3.
- [9] NEPOVIMOVA, Eugenie a Kamil KUČA. Chemical warfare agent NOVICHOK - mini-review of available data. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2018, **121**, 343–350 [vid. 2019-03-19]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2018.09.015
- [10] KLOSKE, Marcin a Zygfryd WITKIEWICZ. Novichoks – The A group of organophosphorus chemical warfare agents. *Chemosphere* [online]. 2019, **221**, 672–682 [vid. 2019-03-19]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.054
- [11] MARRS, Timothy C., Robert L. MAYNARD, Frederick R. SIDELL a Timothy C. MARRS, ed. *Chemical warfare agents: toxicology and treatment*. 2nd ed. Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-01359-5.
- [12] OKUMURA, T., et al. The Tokyo subway sarin attack: disaster management, Part 1: Community emergency response. *Academic Emergency Medicine: Official Journal of the Society for Academic Emergency Medicine* [online]. 1998, **5**(6), 613–617. ISSN 1069-6563. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1553-2712.1998.tb02470.x?sid=nlm%3Apubmed>

- [13] OKUMURA, T., et al. The Tokyo subway sarin attack: disaster management, Part 2: Hospital response. *Academic Emergency Medicine: Official Journal of the Society for Academic Emergency Medicine* [online]. 1998, **5**(6), 618–624. ISSN 1069-6563. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1553-2712.1998.tb02471.x?sid=nlm%3Apubmed>
- [14] OKUMURA, T., et al. The Tokyo subway sarin attack: disaster management, Part 3: National and international responses. *Academic Emergency Medicine: Official Journal of the Society for Academic Emergency Medicine* [online]. 1998, **5**(6), 625–628. ISSN 1069-6563. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1553-2712.1998.tb02472.x?sid=nlm%3Apubmed>
- [15] HOFFMAN, Azik, et al. A decade after the Tokyo sarin attack: a review of neurological follow-up of the victims. *Military Medicine* [online]. 2007, **172**(6), 607–610. ISSN 0026-4075. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Arik_Eisenkraft2/publication/6221738_A_Decade_after_the_Tokyo_Sarin_Attack_A_Review_of_Neurological_Follow-Up_of_the_Victims/links/542e71ce0cf277d58e8eb735/A-Decade-after-the-Tokyo-Sarin-Attack-A-Review-of-Neurological-Follow-Up-of-the-Victims.pdf
- [16] ENSERINK, Martin. Chemical weapons. U.N. taps special labs to investigate Syrian attack. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2013, **341**(6150), 1050–1051. ISSN 1095-9203. Dostupné z: [doi:10.1126/science.341.6150.1050](https://doi.org/10.1126/science.341.6150.1050)
- [17] ROSMAN, Yossi, et al. Lessons learned from the Syrian sarin attack: evaluation of a clinical syndrome through social media. *Annals of Internal Medicine* [online]. 2014, **160**(9), 644–648. ISSN 1539-3704. Dostupné z: [doi:10.7326/M13-2799](https://doi.org/10.7326/M13-2799)
- [18] ONYANGA-OMARA, Jane. U.S. says North Korea used nerve agent VX to assassinate Kim Jong Un's half-brother. *usatoday* [online]. březen 2018 [vid. 2019-03-22]. Dostupné z: <https://www.usatoday.com/story/news/world/2018/03/07/u-s-north-korea-used-chemical-agent-vx-kill-kim-jong-uns-half-brother/402478002/>
- [19] KUŽNÍK, Jan a Daniel JUN. Co zabije ruského špiona Skripala a proč jed novičok v Česku nemáme. *iDNES.cz* [online]. 29. březen 2018 [vid. 2019-03-29]. Dostupné z: https://www.idnes.cz/technet/vojenstvi/novicok-novichol-newcommer.A180327_143957_vojenstvi_kuz
- [20] GORECKI, Lukas, et al. SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Archives of Toxicology* [online]. 2016, **90**(12), 2831–2859 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1432-0738. Dostupné z: [doi:10.1007/s00204-016-1827-3](https://doi.org/10.1007/s00204-016-1827-3)
- [21] GANESAN, K., S. K. RAZA a R. VIJAYARAGHAVAN. Chemical warfare agents. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* [online]. 2010, **2**(3), 166–178 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0976-4879. Dostupné z: [doi:10.4103/0975-7406.68498](https://doi.org/10.4103/0975-7406.68498)

- [22] GEOGHEGAN, James a Jeffrey L. TONG. Chemical warfare agents. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain* [online]. 2006, **6**(6), 230–234 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1743-1816, 1743-1824. Dostupné z: doi:10.1093/bjaceaccp/mkl052
- [23] PITSCHMANN, Vladimír. Overall View of Chemical and Biochemical Weapons. *Toxins* [online]. 2014, **6**(6), 1761–1784 [vid. 2019-03-22]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins6061761
- [24] MISIK, Jan, Ruzena PAVLIKOVA, Jiri CABAL a Kamil KUCA. Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. *Drug and Chemical Toxicology* [online]. 2015, **38**(1), 32–36 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0148-0545. Dostupné z: doi:10.3109/01480545.2014.900070
- [25] MIKA, Otakar J. a Milan ŘÍHA. *Ochrana obyvatelstva před následky použití zbraní hromadného ničení*. Vyd. 1. Praha: Námořní akademie České republiky, 2011. ISBN 978-80-87103-31-9.
- [26] CHAI, Peter R., Bryan D. HAYES, Timothy B. ERICKSON a Edward W. BOYER. Novichok agents: a historical, current, and toxicological perspective. *Toxicology Communications* [online]. 2018, **2**(1), 45–48 [vid. 2019-03-22]. ISSN null. Dostupné z: doi:10.1080/24734306.2018.1475151
- [27] ČOLOVIĆ, Mirjana B., et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* [online]. 2013, **11**(3), 315–335 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1570-159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X11311030006
- [28] GERŠL, Vladimír a Martin ŠTĚRBA. *Farmakologie pro farmaceuty II*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2007. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-1420-5.
- [29] ABOU-DONIA, Mohamed B., Briana SIRACUSE, Natasha GUPTA a Ashly Sobel SOKOL. Sarin (GB, O-isopropyl methylphosphonofluoridate) neurotoxicity: critical review. *Critical reviews in toxicology* [online]. 2016, **46**(10), 845–875 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1040-8444. Dostupné z: doi:10.1080/10408444.2016.1220916
- [30] TATTERSALL, John EH. Anticholinesterase toxicity. *Current Opinion in Physiology* [online]. 2018, **4**, Neuromuscular Junctions, 49–56 [vid. 2019-03-22]. ISSN 2468-8673. Dostupné z: doi:10.1016/j.cophys.2018.05.005
- [31] MUSÍLEK, Kamil, et al. Testování schopnosti známých oximů (pralidoxim, trimedoxim, HI-6, methoxim, obidoxim) reaktivovat chlorpyrifosem inhibovanou acetylcholinesterázu in vitro. *MMSL* [online]. 2005, **74**(5–6), 184–185 [vid. 2019-03-22]. ISSN 03727025, 03727025. Dostupné z: <http://mmsl.cz/doi/10.31482/vzl.2005.041.html>

- [32] SCHWENK, Michael. Chemical warfare agents. Classes and targets. *Toxicology Letters* [online]. 2018, **293**, 100 years after the first use of sulfur mustard - re-emerging threats of chemical warfare agents and current state of medical research, 253–263 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0378-4274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2017.11.040
- [33] BESTE, Ariana, DeCarlos E. TAYLOR, Tsung-Ming SHIH a Thaddeus P. THOMAS. Mechanisms of acetylcholinesterase protection against sarin and soman by adenosine A1 receptor agonist N6-cyclopentyladenosine. *Computational Biology and Chemistry* [online]. 2018, **75**, 74–81 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1476-9271. Dostupné z: doi:10.1016/j.compbiolchem.2018.04.017
- [34] MASSON, Patrick a Florian NACHON. Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning. *Journal of Neurochemistry* [online]. 2017, **142**(S2), 26–40 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1471-4159. Dostupné z: doi:10.1111/jnc.14026
- [35] BAJGAR, Jiří, Josef FUSEK a Vratislav HRDINA. *Vojenská toxikologie*. Hradec Králové: Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně, 1991. ISBN 978-80-85109-36-8.
- [36] BAJGAR, Jiří. Laboratory examination in nerve agent intoxication. *Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic)* [online]. 2014, **56**(3), 89–96 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1211-4286, 1805-9694. Dostupné z: doi:10.14712/18059694.2014.15
- [37] WIERCINSKI, Adam a Jeremy P. JACKSON. Nerve Agents. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019 [vid. 2019-03-22]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493158/>
- [38] PRYMULA, Roman. *Biologický a chemický terorismus: informace pro každého*. 1. vyd. Praha: Grada, 2002. ISBN 978-80-247-0288-9.
- [39] LORKE, Dietrich E. a Georg A. PETROIANU. Reversible cholinesterase inhibitors as pretreatment for exposure to organophosphates. A review. *Journal of Applied Toxicology* [online]. 2019, **39**(1), 101–116 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1099-1263. Dostupné z: doi:10.1002/jat.3662
- [40] KING, Andrew M. a Cynthia K. AARON. Organophosphate and Carbamate Poisoning. *Emergency Medicine Clinics of North America* [online]. 2015, **33**(1), Management of Hazardous Material Emergencies, 133–151 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0733-8627. Dostupné z: doi:10.1016/j.emc.2014.09.010
- [41] COLLOMBET, Jean-Marc. Nerve agent intoxication: Recent neuropathophysiological findings and subsequent impact on medical management prospects. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2011, **255**(3), 229–241 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0041-008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2011.07.003
- [42] MALINAK, David, et al. Novel group of AChE reactivators—synthesis, in vitro reactivation and molecular docking study. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* [online]. 2018, **23**(9) [vid. 2019-03-22]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23092291

- [43] REDDY, Doodipala Samba. Neurosteroids for the potential protection of humans against organophosphate toxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2016, **1378**(1), 25–32 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1111/nyas.13160
- [44] MUSILEK, Kamil, et al. Progress in Antidotes (Acetylcholinesterase Reactivators) Against Organophosphorus Pesticides. *Pesticides in the Modern World - Effects of Pesticides Exposure* [online]. 2011 [vid. 2019-03-22]. Dostupné z: doi:10.5772/17287
- [45] IYENGAR, A. R. Satvik a Abhay H. PANDE. Organophosphate-hydrolyzing enzymes as first-line of defence against nerve agent-poisoning: perspectives and the road ahead. *The Protein Journal* [online]. 2016, **35**(6), 424–439 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1573-4943. Dostupné z: doi:10.1007/s10930-016-9686-6
- [46] BAJGAR, Jiří. Optimal choice of acetylcholinesterase reactivators for antidotal treatment of nerve agent intoxication. *Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic)* [online]. 2016, **53**(4), 207–211 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1211-4286, 1805-9694. Dostupné z: doi:10.14712/18059694.2016.78
- [47] TIMPERLEY, Christopher M., et al. Advice on assistance and protection by the Scientific Advisory Board of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons: Part 2. On preventing and treating health effects from acute, prolonged, and repeated nerve agent exposure, and the identification of medical countermeasures able to reduce or eliminate the longer term health effects of nerve agents. *Toxicology* [online]. 2019, **413**, 13–23 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0300-483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2018.11.009
- [48] BAJGAR, Jiří, et al. Antidota proti bojovým otravným látkám v Armádě ČR a možnosti jejich vývoje. *Urgentní medicína*. 2010, (4).
- [49] KASSA, Jiří a Daniel JUN. Historie - Katedra toxikologie a vojenské farmacie. *Fakulta Vojenského Zdravotnictví Univerzita obrany* [online]. [vid. 2019-03-22]. Dostupné z: <https://www.unob.cz/fvz/struktura/k304/Stranky/historie.aspx>
- [50] JUN, Daniel, et al. Vývoj univerzálního antidota otrav nervově paralytickými látkami na bázi reaktivátorů cholinesteráz: od substance k autoinjektoru. *Urgentní medicína*. 2010, (4).
- [51] YANG, Garp Yeol, et al. Synthesis of bis-pyridinium oxime antidotes using bis(methylsulfonylmethyl) ether for organophosphate nerve agents. *ChemInform* [online]. 2004, **35**(8). Dostupné z: doi:10.1002/chin.200408129
- [52] PATOČKA, Jiří, Jiří CABAL, Kamil KUČA a Daniel JUN. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2005, **3**(2), 91–99 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1214021X, 12140287. Dostupné z: <http://jab.zsf.jcu.cz/doi/10.32725/jab.2005.011.html>

- [53] BAJGAR, Jiri, et al. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. 2007, 7(5), 461–466. ISSN 1389-5575. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/6328528_Treatment_of_Organophosphate_Intoxication_Using_Cholinesterase_ReactivatorsFacts_and_Fiction
- [54] WOREK, Franz a Horst THIERMANN. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2013, 139(2), 249–259 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0163-7258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2013.04.009
- [55] DE JONG, Leo P. A., et al. The bispyridinium-dioxime HLö-7: A potent reactivator for acetylcholinesterase inhibited by the stereoisomers of tabun and soman. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1989, 38(4), 633–640 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(89)90209-8
- [56] KUCA, Kamil, et al. Structure-activity relationship of acetylcholinesterase reactivators. In: *Central and Peripheral Nervous System: Effects of Highly Toxic Organophosphates and Their Antidotes*. 2009, s. 119–128. ISBN 978-81-308-0331-9.
- [57] BALALI-MOOD, Mahdi a Hamidreza SABER. Recent advances in the treatment of organophosphorous poisonings. *Iranian Journal of Medical Sciences* [online]. 2012, 37(2), 74–91 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0253-0716. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3470074/>
- [58] DE KONING, Martijn C., Marco VAN GROEL a Daan NOORT. Peripheral site ligand conjugation to a non-quaternary oxime enhances reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Toxicology Letters* [online]. 2011, 206(1), Selected papers from the 13th Medical Chemical Defence Conference 2011: New Developments in the treatment of intoxications by chemical warfare agents with focus on neurotoxic agents, 54–59 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0378-4274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2011.04.004
- [59] PETROIANU, Georg A. The history of pyridinium oximes as nerve gas antidotes: the British contribution. *Die Pharmazie*. 2013, 68(11), 916–918. ISSN 0031-7144.
- [60] PETROIANU, Georg A. The history of cholinesterase reactivation: hydroxylamine and pyridinium aldoximes. *Die Pharmazie*. 2012, 67(10), 874–879. ISSN 0031-7144.
- [61] EDDLESTON, Michael, Ladislaus SZINICZ, Peter EYER a Nick BUCKLEY. Oximes in acute organophosphate pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians* [online]. 2002, 95(5), 275–283 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1460-2725. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1475922/>
- [62] GORECKI, Lukas, et al. Progress in acetylcholinesterase reactivators and in the treatment of organophosphorus intoxication: a patent review (2006-2016). *Expert opinion on therapeutic patents* [online]. 2017, 27(9), 971–985. Dostupné z: doi:10.1080/13543776.2017.1338275

- [63] MERCEY, Guillaume, et al. Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2012, **45**(5), 756–766 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/ar2002864
- [64] KASSA, Jiri, Jan MISIK, Jana HATLAPATKOVA a Jana Zdarova KARASOVA. A comparison of neuroprotective efficacy of two novel reactivators of acetylcholinesterase called K920 and K923 with the oxime K203 and trimedoxime in tabun-poisoned rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* [online]. 2017, **27**(3), 236–243 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1537-6516. Dostupné z: doi:10.1080/15376516.2016.1275907
- [65] DOLEŽAL, Martin. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3460-9.
- [66] PSOTKA, Miroslav, et al. HLö-7 - A review of acetylcholinesterase reactivator against organophosphorous intoxication. *MMSL* [online]. 2017, **86**(2), 70–83 [vid. 2019-03-22]. ISSN 03727025, 03727025. Dostupné z: doi:10.31482/mmsl.2017.011
- [67] KASSA, Jiří, et al. The present approaches to the development of prophylactic and therapeutic antidotes against nerve agents. *Interdisciplinary Toxicology* [online]. 2008, **1**(1), 18–21 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1337-6853. Dostupné z: doi:10.2478/v10102-010-0026-y
- [68] KUCA, Kamil, et al. Universality of oxime K203 for reactivation of nerve agent-inhibited AChE. *Medicinal Chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))* [online]. 2015, **11**(7), 683–686. ISSN 1875-6638. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/130155/article>
- [69] KASSA, Jiri, Jana KARASOVA, Kamil MUSILEK a Kamil KUCA. An evaluation of therapeutic and reactivating effects of newly developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice. *Toxicology* [online]. 2008, **243**(3), 311–316 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0300-483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2007.10.015
- [70] LUGOKENSKI, Thiago Henrique, et al. Effect of different oximes on rat and human cholinesterases inhibited by methamidophos: a comparative In vitro and in silico study. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. 2012, **111**(6), 362–370 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1742-7843. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-7843.2012.00912.x
- [71] DE KONING, Martijn Constantijn, Gabriele HORN, Franz WOREK a Marco VAN GROL. Discovery of a potent non-oxime reactivator of nerve agent inhibited human acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2018, **157**, 151–160 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2018.08.016

- [72] GUPTA, Bhanushree, et al. In vitro reactivation kinetics of paraoxon- and DFP-inhibited electric eel AChE using mono- and bis-pyridinium oximes. *Archives of Toxicology* [online]. 2014, **88**(2), 381–390 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1432-0738. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-013-1136-z
- [73] WOREK, Franz a Horst THIERMANN. Reactivation of organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase by isonitrosoacetone (MINA): A kinetic analysis. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2011, **194**(2), 91–96 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2011.09.001
- [74] ZEMEK, Filip, Jana Karasova ZDAROVA, Vendula SEPSOVA a Kamil KUCA. Acetylcholinesterase Reactivators (HI-6, Obidoxime, Trimedoxime, K027, K075, K127, K203, K282): Structural Evaluation of Human Serum Albumin Binding and Absorption Kinetics. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, **14**(8), 16076–16086 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms140816076
- [75] BHATTACHARJEE, Apurba K., et al. Discovery of non-oxime reactivators using an in silico pharmacophore model of reactivators for DFP-inhibited acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **90**, 209–220 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2014.11.013
- [76] SHIH, Tsung-Ming, et al. The oxime pro-2-PAM provides minimal protection against the CNS effects of the nerve agents sarin, cyclosarin, and VX in guinea pigs. *Toxicology Mechanisms and Methods* [online]. 2011, **21**(1), 53–62 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1537-6516. Dostupné z: doi:10.3109/15376516.2010.529190
- [77] KALISIAK, Jarosław, Erik C. RALPH a John R. CASHMAN. Nonquaternary Reactivators for Organophosphate-Inhibited Cholinesterases. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **55**(1), 465–474 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm201364d
- [78] KALISIAK, Jarosław, Erik C. RALPH, Jun ZHANG a John R. CASHMAN. Amidine–oximes: reactivators for organophosphate exposure. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2011, **54**(9), 3319–3330 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm200054r
- [79] MASSON, Patrick. Evolution of and perspectives on therapeutic approaches to nerve agent poisoning. *Toxicology Letters* [online]. 2011, **206**(1), Selected papers from the 13th Medical Chemical Defence Conference 2011: New Developments in the treatment of intoxications by chemical warfare agents with focus on neurotoxic agents, 5–13 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0378-4274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2011.04.006
- [80] KORABECNY, Jan, et al. From pyridinium-based to centrally active acetylcholinesterase reactivators. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. 2014, **14**(3), 215–221. ISSN 1875-5607. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/120474/article>

- [81] MERCEY, Guillaume, et al. First efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of poisoned human acetylcholinesterase. *Chemical Communications* [online]. 2011, **47**(18), 5295–5297 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/C1CC10787A
- [82] SHARMA, Rahul, et al. Development and structural modifications of cholinesterase reactivators against chemical warfare agents in last decade: a review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **15**(1), 58–72. ISSN 1875-5607. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/126444/article>
- [83] RICE, Helen, et al. The potential role of bioscavenger in the medical management of nerve-agent poisoned casualties. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2016, **259**, 12th International Meeting on Cholinesterases and 6th Conference of Paraoxonase, 175–181 [vid. 2019-03-22]. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2016.04.038
- [84] YANG, Jun, et al. Rapid-releasing of HI-6 via brain-targeted mesoporous silica nanoparticles for nerve agent detoxification. *Nanoscale* [online]. 2016, **8**(18), 9537–9547 [vid. 2019-03-22]. ISSN 2040-3372. Dostupné z: doi:10.1039/C5NR06658A
- [85] LINHART, Igor. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. 2., upr. a rozš. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014. ISBN 978-80-7080-877-1.
- [86] VOPRŠALOVÁ, Marie a Pavla ŽÁČKOVÁ. *Základy toxikologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1996. ISBN 978-80-7184-282-8.
- [87] PROKEŠ, Jaroslav. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vyd. Praha: Galén : Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2005. ISBN 978-80-246-1085-6.
- [88] ŽĎÁROVÁ-KARASOVÁ, Jana, Kamil KUČA, Daniel JUN a Jiří BAJGAR. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chemické listy*. 2010, (104), 46–50.
- [89] WOREK, Franz, Peter EYER a Horst THIERMANN. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: A versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Testing and Analysis* [online]. 2012, **4**(3–4), 282–291 [vid. 2019-03-22]. ISSN 1942-7611. Dostupné z: doi:10.1002/dta.337
- [90] BARTOSOVA, Lucie, Kamil KUČA, Gabriela KUNESOVA a Daniel JUN. The Acute Toxicity of Acetylcholinesterase Reactivators in Mice in Relation to Their Structure. *Neurotoxicity Research* [online]. 2006, **9**(4), 291 [vid. 2019-04-24]. ISSN 1476-3524. Dostupné z: doi:10.1007/BF03033319
- [91] HAMILTON, Murray G., Robert FREW a Paul M. LUNDY. Effect of endothelin on Ca²⁺ influx, intracellular free Ca²⁺ levels and ligand binding to N and L type Ca²⁺ channels in rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1989, **162**(3), 1332–1338 [vid. 2019-04-24]. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(89)90819-X

- [92] BESTER, Stephanie M., et al. Structural Insights of Stereospecific Inhibition of Human Acetylcholinesterase by VX and Subsequent Reactivation by HI-6. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2018, **31**(12), 1405–1417 [vid. 2019-04-24]. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.8b00294
- [93] SOUKUP, O., et al. Oxime reactivators and their in vivo and in vitro effects on nicotinic receptors. *Physiological Research*. 2011, **60**(4), 679–686. ISSN 1802-9973.
- [94] KASSA, Jiří, Jana ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ, Vendula ŠEPSOVÁ a Jiří BAJGAR. A comparison of the reactivating and therapeutic efficacy of the newly developed bispyridinium oxime K203 with currently available oximes, in sarin poisoned rats and mice. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2011, **9**(4), 225–230 [vid. 2019-04-30]. ISSN 1214021X, 12140287. Dostupné z: doi:10.2478/v10136-011-0011-6
- [95] KOVARIK, Zrinka, et al. Oximes: Reactivators of phosphorylated acetylcholinesterase and antidotes in therapy against tabun poisoning. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2008, **175**(1), Proceedings of the IX International Meeting on Cholinesterases, 173–179 [vid. 2019-04-30]. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2008.04.011
- [96] KARASOVA, Jana, Filip ZEMEK, Jiří KASSA a Kamil KUČA. Entry of oxime K027 into the different parts of rat brain: Comparison with obidoxime and oxime HI-6. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2014, **12**, 25–29. Dostupné z: doi:10.1016/j.jab.2013.01.001
- [97] JOOSEN, Marloes J. A., et al. Efficacy of atropine sulfate/obidoxime chloride co-formulation against sarin exposure in guinea pigs. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2018, **296**, 34–42 [vid. 2019-05-07]. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2018.09.004
- [98] KASSA, Jiri, et al. A comparison of the reactivating and therapeutic efficacy of two novel bispyridinium oximes (K727, K733) with the oxime HI-6 and obidoxime in sarin-poisoned rats and mice. *Toxicology Mechanisms and Methods* [online]. 2015, **25**(3), 229–233 [vid. 2019-05-09]. ISSN 1537-6516. Dostupné z: doi:10.3109/15376516.2015.1036333