

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLÓGIE A TOXIKOLÓGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**In vivo hodnotenie účinnosti nového reaktivátora voči
tabunu.**

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Marie Vopršalova, CSc.

Konzultant: mjr. PharmDr. Vendula Hepnarová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Natália Kuzmiaková

Pod'akovanie

Touto cestou by som chcela pod'akovať mojej konzultantke mjr. PharmDr. Vendule Hepnarovej, PhD. za odborný prístup, pomoc pri práci v laboratóriu, trpezlivosť a ochotu.

Ďakujem takisto vedúcej mojej práce PharmDr. Marii Vopršalovej, CSc. za možnosť pracovať pod jej vedením.

Rada by som pod'akovala zamestnancom katedry Toxikológie a vojenskej farmacie Fakulty vojenského zdravotníctva Univerzity obrany v Brne, za možnosť zrealizovať túto prácu a všetkým, čo prispeli k dokončeniu tejto diplomovej práce.

V neposlednej rade ďakujem svojej rodine a priateľovi, vďaka ktorým môžem študovať, a ktorí ma v tomto štúdiu podporujú.

Čestne prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu rovnakého alebo iného titulu.

V Hradci Králové

Podpis:

Abstrakt

Univerzita Karlova v Prahe

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Kandidát: Natália Kuzmiaková

Vedúci: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc .

Konzultant: mjr. PharmDr. Vendula Hepnarová, PhD.

Názov diplomovej práce: In vivo hodnotenie účinnosti nového reaktivátoru voči tabunu.

Táto štúdia sa zaoberá problematikou nevratnej inhibície enzýmu acetylcholinesteráza (AChE). Enzým AChE rozkladá neurotransmitter acetylcholín (ACh), ktorý zabezpečuje prenos nervových impulzov v centrálnej nervovej sústave aj na periférii. Organofosfáty (OP) sú práve tie látky, ktoré spôsobujú ireverzibilnú blokádu AChE, čo vedie k nahromadeniu ACh na synapsiách a spôsobuje mnoho centrálnych, muskarínových a nikotínových príznakov až život ohrozujúci stav. Reaktivátory oximovej povahy preukázali zatiaľ najväčší potenciál pri vyviazaní OP z väzby na AChE.

Keďže reaktivačné schopnosti doposiaľ syntetizovaných oximov stále nie sú dostačujúce, výskum stále hľadá nové reaktivátory. Cieľom mojej práce bolo otestovať reaktivačný potenciál jedného z nich, a to oximu K 870.

Metódou použitou pri testovaní bola kolorimetrická Ellmanova metóda modifikovaná podľa Bajgara, kde sa aktivita AChE po reaktivácii merala na základe absorbancie nameranej vo vzorkách mozgov, bránic a krvi modelových organizmov. Ako modelové organizmy slúžili potkany.

Experiment poskytuje možnosť porovnania schopnosti reaktívácie testovaného reaktivátora K 870 s pralidoximom ("zlatý štandard"), s atropínom alebo HI- 6. Potkanom bola podaná dávka tabunu $LD_{50} = 200 \mu\text{g/kg}$ intramuskulárne. Výsledky jasne ukazujú, že pralidoxim (dávka 179 mg/kg) reaktivoval AChE najslabšie zatiaľ čo u HI-6 (dávka 81 mg/kg)

je viditeľná vyššia aktivita enzýmu. Potenciálne antidotum K 870 (dávka 100 mg/kg) dosiahlo najvyššiu reaktiváciu enzýmu AChE v krvi spomedzi testovaných oximov. V mozgu sa stupeň reaktivácie podobal na schopnosť reaktivácie pralidoximu, čo znamená, že táto látka pravdepodobne ťažko prestupuje hematoencefalickú bariéru (HEB) a schopnosť reaktivácie v mozgu je tým pádom veľmi nízka až nulová. U bránice sa po porovnaní dá povedať, že oxim K 870 je schopný reaktivácie ale oximu HI-6 sa nevyrovná.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Natália Kuzmiaková

Supervisor: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc .

Consultant: mjr. PharmDr. Vendula Hepnarová, Ph.D.

Title of diploma thesis: In vivo evaluation of the efficacy of the novel reactivator against tabun.

This study tackles the problem of irreversible inhibition of acetylcholinesterase (AChE). This enzyme degrades neurotransmitter acetylcholine (ACh), which ensures transmission of nerve impulses in central nervous system and in periphery. Organophosphates (OP) are substances that cause irreversible blockade of AChE and that subsequently leads to accumulation of AChE in synapses and inducing of muscarinic and nicotinic effects for life threatening condition. Oximic nature reactivators shown to this day the greatest potential in inhibiting OP bond with AChE.

Because reactivation abilities of to date synthesized oxime are not sufficient, new reactivators are being researched. The goal of my work was to test the potential to reactivate AChE one of them (precisely oxime K 870).

The method I used was colorimetric Ellman method modified by Bajgar, where the activity of AChE after reactivation was measured by absorbance in brain, diaphragm and blood of modeled organisms. The organisms used were rats.

This experiment provide the possibility of comparison of reactivation capabilities of K 870 oxime with pralidoxime („golden standart“), atropine or HI-6. Rats were administered with a dose of tabun $LD_{50} = 200 \mu\text{g}/\text{kg}$ intramuscularly. Results clearly shows that pralidoxime (dose 179 mg/kg) reactivated AChE the weakest, where HI-6 (dose 81mg/kg) accomplished higher activity of the enzyme among those tested. The reactivation level in the brain was similar to that of pralidoxime, which means this compound potentially rarely passed through HEB and therefore reactivation potential headed to zero. In the diaphragm the oxime K 870

is sufficient to reactivate receptors but is not as effective as HI-6. Of all this factors arise that oxime K 870 can to a point reactivate AChE on peripheries.

Obsah

1.ÚVOD	10
2.TEORETICKÁ ČASŤ	12
2.1 Acetylcholín	12
2.2 Cholinesterázy (ChE)	13
2.2.1 Acetylcholinesteráza (AChE)	13
2.2.2 Štruktúra AChE a proces hydrolýzy	14
2.2.3 Butyrylcholinesteráza	15
2.3 Organofosfáty (OP)	17
2.3.1 História OP	17
2.3.2 Štruktúra OP	18
2.3.3 Členenie OP	19
2.3.4 Mechanizmus inhibície AChE OP	22
2.3.5 Intoxikácia OP	23
2.3.6 Inhibítory AChE ako predmet terapie	25
2.4 Reaktivátory AChE	27
2.4.1 História reaktivátorov AChE	27
2.4.2 Štruktúra reaktivátorov AChE	28
2.4.3 Členenie reaktivátorov AChE	28
2.4.4 Mechanizmus účinku reaktivátorov AChE	30
2.4.5 Chemické vlastnosti reaktivátorov AChE	31
2.4.6 Farmakokinetika reaktivátorov AChE	32
2.5 Terapia intoxikácie OP	33
3.CIEĽ PRÁCE	35
4.EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	36
4.1 Príprava roztokov	36
4.2 Vybrané zvieratá	37
4.3 Prístroje a pomôcky	37
4.4 Chemikálie	38
4.5 Kalibrovanie prístroja	40
4.6 Ellmaova metóda	41
4.6.1 Princíp metódy	28
4.7 Postup stanovenia miery reaktivácie AChE oximom	43
4.7.1 BRÁNICA	43

4.7.2 KRV.....	44
4.7.3 MOZOG.....	45
5.VÝSLEDKY.....	46
6.DISKUSIA.....	50
7.ZÁVER.....	55
8.ZOZNAM SKRATIEK.....	56
9.ZOZNAM TABULIEK.....	58
10.ZOZNAM OBRÁZKOV, SCHÉM A ROVNÍC.....	59
11.ZOZNAM GRAFOV.....	60
12.ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	61

1. Úvod

Reaktivátory enzýmu AChE pomáhajú liečiť otravy spôsobené organofosfátmi. Mechanizmus účinku týchto reaktivátorov spočíva v odstránení väzby medzi AChE a organofosfátom, ktorý spôsobuje jej nevratnú inhibíciu. Téma nervovoparalytických látok (NPL), ku ktorým organofosfáty patria je vo svete stále veľmi naliehavá a ich výskum tak naberá na dôležitosť. NPL odštartovali svoje pôsobenie ako pesticídy a používajú sa tak dodnes. Veľmi rýchlo sa prišlo na ich toxické účinky, a preto sa v minulosti nejdenný krát stali predmetom zneužívania. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) zaznamenala veľmi vysoké množstvo (cez milión) neúmyselných otráv a viac než dva milióny pokusov o samovraždu organofosfátmi obsiahnutými v pesticídoch. Avšak okrem pokusov o samovraždu a neúmyselných otráv sú v rozvojových krajinách NPL dodnes veľkým problémom. Používajú sa totižto na otravy úmyselné a kvôli obťažnému prístupu k lekárskej starostlivosti tam zapríčiňujú okolo 300 000 úmrtí ročne.

Pomerne lacná a jednoduchá výroba organofosfátov viedla k myšlienke použiť ich ako zbrane pre teroristické účely. O naplnenie tejto myšlienky sa postarali v roku 1995 členovia japonského kultu Óm Šinrikjó, ktorí zneužili sarin a vypustili ho v Tokijskom metre medzi civilné obyvateľstvo. Vyžiadali si 12 ľudských obetí a do histórie sa zapísal ako 1. prípad zneužitia NPL na teroristické účely. Obava z takéhoto zneužitia NPL stále pretrváva.

Ďalším dôkazom, že NPL rozhodne nie sú látkami minulosti je nedávny útok na potenciálneho severokórejského vodcu Kim Čong-nama, ktorý zomrel na letisku v Kuala Lumpur v roku 2016. V jeho organizme boli nájdené stopy po látke VX, ktorá nepochybne spadá do skupiny organofosfátov.

V roku 2018 bol ruský špión Sergej Skripal spoločne s dcérou otrávený látkou zo skupiny Novičok. Jedná sa o skupinu látok, ktorých základ tvorí 5-10 x toxickejší izomér substancie VX. U týchto látok môže aj po podaní reaktivátora dôjsť k fatálnym následkom otravy. Prejavujú sa rozsiahlou periférnou neuropatiou.

Okrem vyššie zmieňovaných príkladov zneužitia NPL je nutné v neposlednej rade spomenúť zneužitie organofosfátov na vojenské účely. Svedčí o tom vojenský konflikt Iraku proti Iránu, kde boli tieto látky v rokoch 1980 - 1988 použité ako chemické zbrane, konkrétne

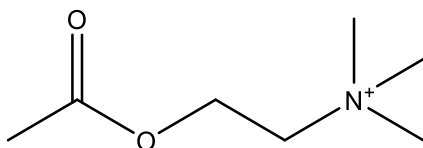
sarin a tabun. Tieto príklady jasne poukazujú na nutnosť ďalšieho výskumu reaktivátorov AChE.

Organofosfáty sú stálym a závažným ohrozením zdravia širokej skupiny nielen vojakov ale aj civilistov. Terapia otráv spôsobených NPL pozostáva z reaktivátorov AChE čo sú špecifické antidotá s oximovou funkčnou skupinou, z anticholinergných látok konkrétne z atropínu a z diazepamu, ktorý plní funkciu antikonvulzívnej látky.

Reaktivátory AChE prešli dlhým procesom výskumov, kde sa z menej účinných monopyridínových (pralidoxim) zlúčenín postupne prišlo na omnoho účinnejšie bispyridínove zlúčeniny (HI-6, LueH-6, K203 atď.) vhodné k terapii spomínaných otráv. Napriek faktu, že žiadne univerzálne antidotum sa nenašlo, snaha vedcov stále pokračuje a doposiaľ užívané antidotá sa ďalej zdokonaľujú, konkrétne ich farmakokinetické vlastnosti. Takisto sa pokračuje aj vo výskume nových oximov o čom svedčí aj táto diplomová práca s cieľom určiť aktivitu nového reaktivátora K 870 voči tabunu.

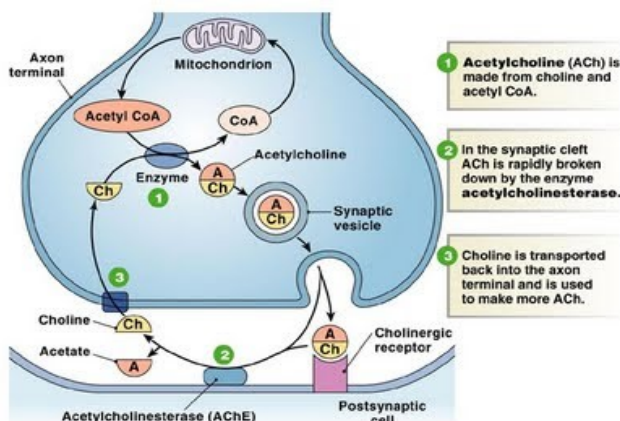
2. Teoretická časť

2.1 Acetylcholín



Obrázok 1 Štruktúra ACh
Zdroj: ChemDraw

Z chemického hľadiska je táto molekula tvorená esterom kyseliny octovej a cholínom (Obrázok 2). ACh je neurotransmitter, ktorý sa nachádza v dreni nadobličiek, nervovosvalovej platničke, pregangliových neurónoch parasimpatiku a sympatiku, na mnohých autonómne inervovaných orgánoch a na synapsiách CNS. Molekula ACh je syntetizovaná z cholínu podávaného potravou, ten je acetylovaný enzýmom cholínacetyltransferáza (ChAT) za prítomnosti acetylkoenzýmu A (Obrázok 3). Jeho hlavnou úlohou je sprostredkovanie nervového impulzu. Syntéza ACh prebieha na presynaptickej časti neurónu pomocou enzýmu ChAT. ACh vzniká z už mieneného cholínu, ktorý sa spätne vstrebáva do presynaptickej časti neurónu po degradácii ACh enzýmom AChE a z acetyl-CoA. Po prílive nervového vzruchu do presynaptickej časti neurónu sa ACh uvoľní do synaptickej štrbiny a viaže sa na postsynaptické receptory alebo na spomínanú AChE umiestnenú taktiež postsynapticky. AChE rozkladom ACh zabraňuje nadmernej stimulácii receptorov, čiže tvorbe nadmerného nervového impulzu na synapsiách a nervovosvalovej platničke. Keďže ACh sa nachádza vo svalových vláknach, neprimeraná tvorba nervového impulzu vedie k svalovým kŕčom a poruchy spojené s ACh môžu byť taktiež príčinou ďalších vážnych ochorení (Martínková et al., 2007).



Obrázok 2 Súhrn dejov spojených s ACh v organizme
Zdroj: (online 10.4.2020)

2.2 Cholinesterázy (ChE)

ChE, ako aj ostatne enzýmy, sú polymérne štruktúry zložené z reťazcov aminokyselín. Vyskytujú sa v organizme a spôsobujú rozklad (hydrolyzu) esterov cholínu. Radia sa medzi serínové hydrolázy, pretože v ich aktívnom mieste sa nachádza serín (Ser), prostredníctvom ktorého sa na enzým uchyťí substrát. Do tejto skupiny patria okrem ChE aj karboxylesterázy a lipázy (Sultatos, 2006).

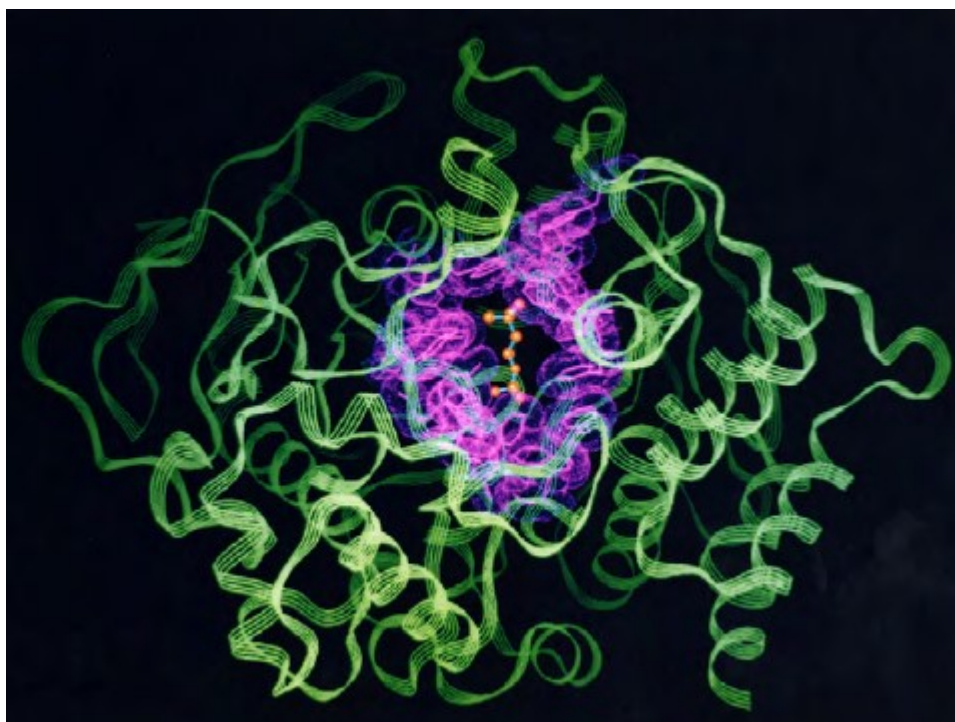
Keďže sa tieto proteíny nachádzajú okrem iného v krvi, asi pred 90 rokmi bolo odporované, že ChE plazmy sa líši od ChE erytrocytov. Na základe tohto zistenia boli rozlíšene: AChE (pravá, špecifická hydroláza) vyskytujúca sa na membráne erytrocytov a butyrylcholinesteráza (BChE) (pseudocholinesteráza, nešpecifická hydroláza) vyskytujúca sa v plazme (Kutty, 1980). AChE je v aminokyselinovom reťazci na 54% identická s BChE (Korabecny et al., 2014). Tieto enzýmy sa líšia rýchlosťou štiepenia rôznych substrátov a podľa toho boli aj nazvané. Zatiaľ čo AChE hydrolyzuje prednostne ACh a acetyl beta metylcholín, BChE je menej špecifická a štiepi ACh, butyrylcholín (BCh), benzylcholín a propionylcholín. Je to z dôvodu usporiadania bočných reťazcov aminokyselín v aktívnom mieste enzýmu. Aktívne miesto BChE je priestorovo usporiadane na väčšie substráty. Zásadný rozdiel medzi týmito dvoma proteínmi je takisto v ich funkcii. Kdežto hlavná funkcia AChE je zastavenie nervového impulzu spôsobeného ACh, funkcia BChE nie je úplne známa, predpokladá sa, že hrá rolu v metabolizme lipidov (Sultatos, 2006).

2.2.1 Acetylcholinesteráza

AChE je proteín s molekulovou hmotnosťou asi 80 000 Da (Kutty, 1980). Patrí medzi najefektívnejšie enzýmy u ľudí. Vyskytuje sa v svaloch a nervoch, motorických aj senzorických nervových bunkách centrálnom a periférnom nervovom systéme, a taktiež v membránach erytrocytov. V motorických neurónoch je pozorovaný väčší výskyt AChE než v senzorických (Sussman et al., 1991). Enzým AChE je známy svojou schopnosťou rozkladať ACh na cholín a kyselinu octovú a zastaviť tak šírenie prílišných nervových vzruchov. Proteín je schopný rozštiepiť až 25 000 molekúl ACh za sekundu (Čolović, 2013). Miestom výskytu tohto enzýmu je postsynaptická časť neurónu, obaľuje ho sieť kolagénnych vlákien a glykosaminoglykánov (Ledvina, 2009).

2.2.2 Štruktúra AChE a proces hydrolýzy ACh

Enzým AChE sa skladá z α/β monomérov. Jednotlivé monoméry obsahujú 537 aminokyselín a pozostávajú zo 14 α -helixových závitníc, obklopujúcich 12 β -skladaných listov (Obrázok 1) (Acheampong et al., 2012). Molekula obsahuje obzvlášť napadnú úzku, v základe sa rozširujúcu aromatickú štrbinu približne 18-20 Å hlbokú, ktorá siaha do polovice tohto enzýmu. Nachádza sa tu aktívne miesto vzdialene asi 4 Å od dna štrbiny. Okrem aromatickej štrbiny, sa na bielkovine nachádza aj periférne anionické miesto, ktoré sa úplne líši od štruktúry aktívneho miesta. Toto miesto taktiež interaguje s AChE (Sussman et al., 1991).



Obrázok 3 Štruktúra AChE
Zdroj: (Hay, 2010)

Kinetické štúdie nasvedčujú tomu, že aktívne miesto sa skladá z esterovej a anionickej časti. Obsahuje však aj oxyanionovú časť tvorenú NH peptidickými skupinami aminokyselín glycín¹²¹ (Gly), Gly¹²² a alanín²⁰⁴ (Ala). Naprieč spomínanou aromatickou štrbinou sa tiahne 14 aromatických kruhov vedúcich k anionickej časti aktívneho miesta AChE. Anionická časť obsahuje bočné reťazce aromatických aminokyselín fenylalanín²⁹⁵ (Phe), Phe²⁹⁷ a tyrozín³³⁷ (Tyr). Predpokladá sa, že uvedené aromatické kruhy zodpovedajú za naorientovanie molekuly substrátu čiže ACh, do štrbiny k aktívnemu miestu tak, aby bola možná jeho hydrolýza. Lokalizáciu ACh sprostredkujú π elektróny aromatických jadier, ktoré priťahujú kvartérny

amóniový kation cholínu a interagujú s ním. Zároveň tak priblížia esterovú väzbu k Ser, ktorý zahajuje štiepenie ACh. Ser²⁰³ je súčasťou katalytickej triády spolu s His⁴⁴⁷ a Glu³³⁴ a ide o esterickú časť AChE, kde Ser pôsobí ako nukleofil, histidín (His) ako báza a kyselina glutámová (Glu) ako kyselina (Zrinka Kovarik, 2003). AChE sa líši od Ser hydroláz výskytom Glu v katalytickej triáde namiesto aspartátu (Asp) (Sussman et al, 1991).

Celý proces iniciuje Ser, ktorý sa správa ako nukleofil a pomocou kyslíka hydroxylovej skupiny atakuje karboxylový uhlík ACh, čo vedie k rozštiepeniu esterovej väzby za vzniku acyl-serinu. Vodík uvedenej hydroxylovej skupiny Ser putuje ku His, ktorý ho ako báza prijme a vytvorí kation. His kation odovzdá vodík záporne nabitému kyslíku Ch. Ch, ktorý vznikol štiepením ACh sa vracia z postsynaptickej časti neurónu (miesta pôsobenia AChE) do presynaptickej časti neurónu. Nasleduje proces deacetylácie acyl-enzymu, v tomto prípade Ser. Voda pomocou His ako nukleofil, napadne esterickú väzbu acyl-Ser a procesom podobným predchádzajúcemu vznikne kyselina octová a enzým v pôvodnom stave (Schéma 1) (Wymore, 2014).

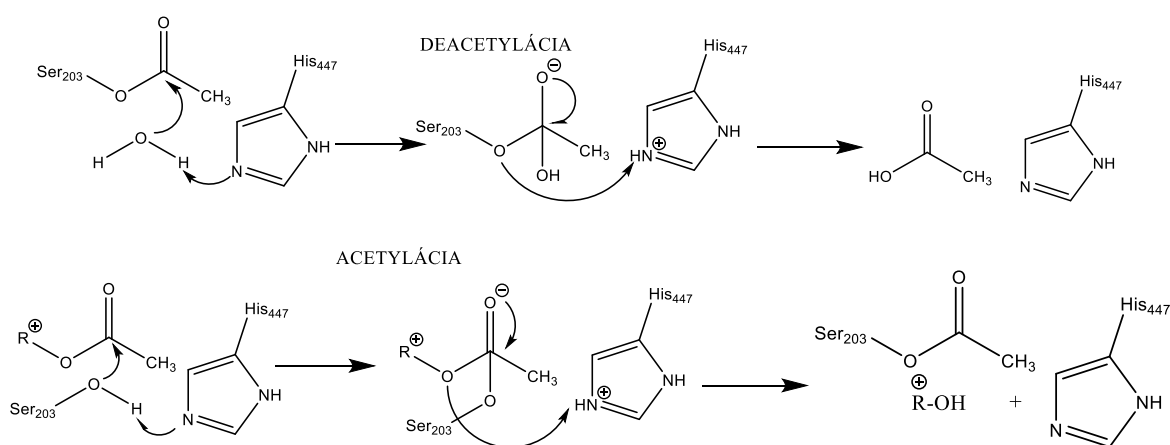


Schéma 1 Proces hydrolyzy ACh pomocou AChE
Zdroj: ChemDraw

2.2.3 Butyrylcholinesteráza

BChE je glykoproteín s tetramérnou štruktúrou a každá jeho podjednotka je zložená z 574 aminokyselín. Okrem štruktúrnej podobnosti s AChE má 28% podobnosť s hovädzím tyroglobulínom. BChE má takisto širšie aktívne miesto v porovnaní s AChE, čo sa využíva aj pri dôkazoch na rozlíšenie BChE od AChE (Lockridge, 1987).

Vznik BChE v organizme je pozorovaný predovšetkým v pečeni a keďže chemická aktivita BChE pri poškodení pečene klesá, analýza aktivity BChE v plazme tak môže byť

smerodajná pri testovaní pečňových funkcií. Nevýhodou tohto testovania však môže byť nízka senzitivita BChE (Saxena, 2006).

Napriek tomu, že sa tento enzým zapája do metabolizmu mnohých látok (prokain, sukcinylcholín, kokain, heroin...) fyziologická funkcia BChE nie je úplne známa (Sultatos, 2006). Organizmy s deficitom tohto enzýmu dokonca nevykazujú žiadne známky nejakých ochorení, čo je manifestované aj myšami s tzv. knock-outovaným génom pre BChE (Manoharan, 2007; Li, 2008). Jediné čo sa preukázalo bola väčšia citlivosť na myorelaxancia prejavujúca sa pretrvávajúcou dychovou insuficienciou po ich podaní (Yen, 2003).

Špecifický fenotyp spôsobený prítomnosťou tzv. alely K sa taktiež javí ako deficit BChE. Bolo to odpozorované na základe nižšej plazmatickej aktivity a nižšej afinity k sukcinylcholínu. Oblasťou s vysokým percentom výskytu alely K vo fenotype je oblasť Kavkazu. Od klasickej BChE sa K typ BChE líši v náchylnosti na inhibíciu dibukainom. Zatiaľ čo klasická BChE je na inhibíciu dibukainom náchylná K typ BChE na túto inhibíciu náchylný nie je (Holmes, 2005; Kallow, 1957).

2.3 Organofosfáty

Organofosfáty (OP) obsahujú vo svojej molekulárnej štruktúre fosfor a po chemickej stránke sa radia medzi estery či tioly kyseliny fosforečnej, amidofosforečnej, fosfónovej alebo fosfinovej (Jokanović, 2009). Molekuly OP môžu mať stály alebo nestály charakter. Stále OP môžu pretrvávať v priestore hodiny, dni či roky, zatiaľ čo nestále sa v prostredí držia len niekoľko sekúnd alebo minút a potom sa vyparujú do ovzdušia (Pitschmann, 20014). Tieto látky sú značne toxické a vysoko lipofilné, čo im dáva možnosť rýchlo a účinne prejsť bariérami organizmu počnúc neporušenou kožnou bariérou. Výnimkou nie je ani hematoencefalická bariéra, ktorá taktiež prepúšťa tieto nebezpečne toxické látky na miesto ich pôsobenia, ktoré je okrem iného aj centrálna nervová sústava (CNS) v mozgu. Cesta vstupu OP môže byť rôzna, môžu byť vstrebané zmienenou neporušenou kožnou bariérou, taktiež môžu byť vdýchnuté alebo perorálne podané. Centrum ich pôsobenia sa nachádza v nervových tkanivách, kde sa zhromažďujú a viažu sa kovalentnou väzbou na zmienený enzým AChE, čím spôsobia jeho inhibíciu. Ak nedôjde k okamžitej hydrolýze tejto vzniká toxický stav pretože AChE po inhibícii nie je schopná naďalej splňať svoju fyziologickú funkciu a to vedie k tzv. cholinergnému syndrómu (Bajgar, 2004).

2.3.1 História OP

Látky tohto typu boli objavené a popísané práve vďaka ich insekticídnym účinkom, no neskôr sa však prišlo aj na ich iné vlastnosti a to toxické. Po tomto zistení bolo jasné, že nie všetky OP sú vhodné na ochranu potravín pred škodcami kvôli spomínaným toxickým účinkom na človeka. Avšak OP našli svoje uplatnenie vo vojenskom priemysle ako chemické zbrane (ChZ) hromadného ničenia. Samozrejme tie stále (menej tekavé) aby zabránili nepriateľským jednotkám v potupe k ďalšiemu územiú (Pitschmann, 20014).

Celý výskum OP začal v Nemecku, v 30. rokoch 20. storočia, konkrétne v laboratóriu IG Farben pod vedením chemika Gerharda Schrädera. Tento výskum sa však zaoberal prípravou nových insekticídov z radov organických zlúčenín fosforu a fluorofosforu. Ako je už vyššie vylíčené, po zistení toxických účinkov OP na človeka sa z pôvodne insekticídnych látok stali ChZ to aj z dôvodu blížiacej sa 2. svetovej vojny (Cabal, 1999). Dátum 23.12.1936 sa považuje za dátum prípravy prvého OP so zámerom vojenského využitia. Zmienenou zlúčeninou bola tzv. G látka s kódom GA a s názvom tabun. V rokoch 1942-1945, čiže počas 2. svetovej vojny bolo v Nemecku preukázaných 30 000 ton vyrobeného tabunu.

Tento tabun však nebol vo vojne využitý. V syntéze látok tejto povahy sa pokračovalo, čo dokazuje vznik sarinu. Tento názov vyplýva z mien jeho tvorcov. Výskum tabunu a sarinu viedol k vynájdeniu analógiu sarinu a to k somanu. Zvýšená syntéza tohto analógu bola odpozorovaná takisto počas 2. svetovej vojny opäť Nemeckom (Bajgar, 2006; Pitschmann, 2003; Klement, 2011) .

Napriek veľkým zásobám sa počas 2. svetovej vojny tieto látky vo vojnovom konflikte neuplatnili. Svoje uplatnenie však našli neskôr v konflikte medzi Iránom a Irakom (80. roky 20. storočia), menovite sarin a tabun (Marrs et al., 2007). Neskôr boli expozícii vystavení cestujúci v metre počas teroristického útoku v Japonskom meste Tokio (90. roky 20. storočia). K útoku bol použitý sarin a vyžiadal si 12 ľudských obetí a 5 500 zranených (Pletcher, 2010). Jedným z ďalších z použití OP bola občianska vojna v Sýrii. Tieto látky, konkrétne sarin, boli nezákonne zneužitú a vyžiadali si 1729 ľudských životov (Enserink, 2013; Rosman et al., 2014). Napriek prísny m legislatívnym zákazom zneužívania týchto látok, sa vo svete naďalej vyskytujú udalosti spojené s OP, čomu nasvedčujú aj mnohé ďalšie nezmiernené závažné prípady z minulosti.

2.3.2 Štruktúra OP

Základnou kostrou OP je organická štruktúra ktorú tvorí ester alebo thiol fosfinovej, fosfónovej alebo amidofosforečnej kyseliny a rozvetvený alkylový/arylový uhl'ovodíkový reťazec (Obrázok 4).

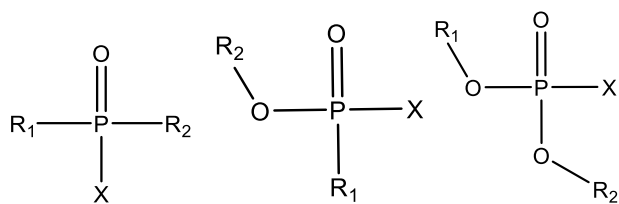
Základ štruktúry OP: fosfáty – alkylová/arylová skupina je naviazaná cez atóm kyslíka

fosfonáty – alkyl/aryl je viazaný rovno atómom fosforu

fosfoamidy - amin je mono alebo disubstituovaný alkylom/arylom alebo molekula obsahuje -NH₂ skupinu

Opis skupín na molekule OP: atóm viazaný dvojitou väzbou môže byť kyslík alebo síra. Označenie X patrí odstupujúcej skupine, to je názov pre skupinu, ktorá sa počas hydrolýzy OP naviaže na AChE. Môže to byť alifatický, aromatický, heterocyklický zvyšok, tioskupina alebo kyanidová skupina ci halogén (Jokanović, 2009).

Podmienky fungujúceho OP: terminálny atóm kyslík viazaný dvojitou väzbou na atóm fosforu, dve lipofilné skupiny R¹, R² viazané priamo na fosfor alebo cez kyslík a odstupujúca skupina X s priamou väzbou na fosfore (Greene, 2005).



Obrázok 4 Základne štruktúry OP/ fosfátov/ fosfonátov , kde X je odstupujúca skupina a R1, R2 je alkyl alebo aryl
Zdroj: ChemDraw

2.3.3 Členenie OP

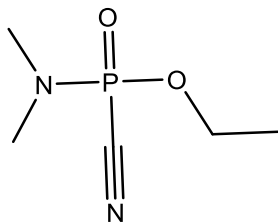
OP sa delia na látky typu V, látky typu G, látky typu A a činidlo IVA, ktoré svojim chemickým zložením pripomína obe skupiny (Gorecki et al., 2016).

Čo sa týka G látok označenie G pochádza zo slova Germany čiže Nemecko. Patria tu už vyššie uvedené látky ako tabun, sarin, soman. ale aj cyklosarin skrátene cyklosin. Spomínané činidlá sú bezfarebné, bez zápachu, prípadne majú jemne kvetinový nádych (Mercey et al., 2012). Sú schopné udržať sa v priestore aj niekoľko hodín závisle na podmienkach priestoru (Pitschmann, 20014). Ich štruktúry sú znázornené v tabuľkách 1-4.

Názvom V činidlá sa označujú OP nasyntetizované po 2. svetovej vojne, kde VX označuje Veľkú Britániu, a VRX Rusko podľa pôvodu vzniku týchto látok. V látky majú jantárovú farbu a mimo iné sa od G látok odlišujú výrazne nižšou tekavosťou čo im umožňuje dlhšiu expozíciu v priestore (týždne až mesiace). Zároveň oproti G látkam rapídne stúpa ich toxicita. Toxicita V látok je 100x väčšia v porovnaní so sarinom (Pitschmann, 20014; Mercey et al., 2012). V činidlá znázorňujú tabuľky 5 a 6.

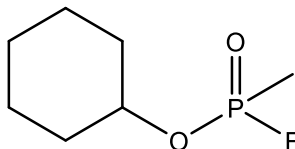
Okrem vyššie vymenovaných skupín existuje ešte jedna skupina NPL: činidlá podskupiny A (Novičok). V porovnaní s V činidlami sú tieto látky 5-10x toxickejšie. Ich presné zloženie zatiaľ nie je plne objasnené avšak majú OP základ. Mechanizmus účinku sa líši od ostatných OP v tom, že látky skupiny Novičok postihujú aj periférne senzorické nervové vlákna čo sa prejavuje preukázateľnými periférnymi neuropatiami (Kloske, 2019; Chai, 2018). Výroba týchto látok je relatívne bezpečná pretože Novičok sa dá vyrobiť z dvoch nezávislých, málo toxických látok, ktoré po zlúčení dávajú NPL (Nepovimova, 2018).

Látky typu G



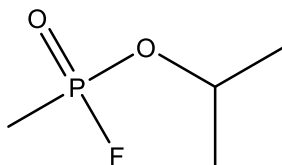
Názov látky	tabun
Systémový názov látky	ethyl-dimethylfosforamidokyanidat
Kód látky	GA

Tabuľka 1 Základné informácie o tabune
Zdroj: (Pitschmann, 2003)



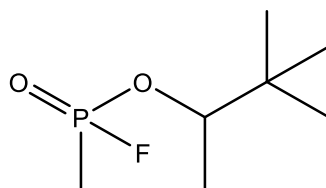
Názov látky	cyklosarin
Systémový názov látky	cyklohexyl-methylfosfonofluoridát
Kod látky	GF

Tabuľka 2 Základné informácie o cyklosarine
Zdroj: (Pitschmann, 2003)



Názov látky	sarin
Systémový názov látky	isopropyl-methylfosfonofluoridát
Kód látky	GB

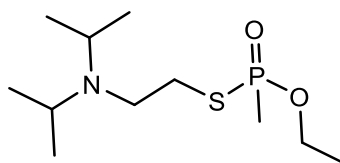
Tabuľka 3 Základné informácie o sarine
Zdroj: (Pitschmann, 2003)



Názov látky	soman
Systemový názov látky	(3,3-dimethyl-2-butyl)methylfosfonofluoridát
Kód látky	GD

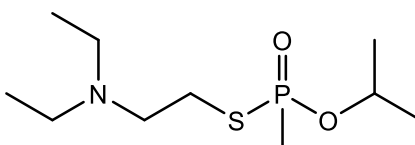
*Tabuľka 4 Základné informácie o somane
Zdroj: (Pitschmann, 2003)*

Látky typu V



Názov látky	VX
Systemový názov látky	S-(2-(diisopropylamino)ethyl)-Oethylmethylfosfonotiát
Kód látky	VX

*Tabuľka 5 Základné informácie o látke VX
Zdroj: (Pitschmann, 2003)*



Názov látky	Ruská VRX
Systemový názov látky	S-(2-(diethylamino)ethyl)-Oisopropylmethylfosfonothiát
Kód látky	VRX

*Tabuľka 6 Základné informácie o VRX
Zdroj: (Pitschmann, 2003)*

2.3.4 Mechanizmus inhibície AChE OP

Ako bolo už pár krát zmienené, hlavnou úlohou AChE je rozštiepenie ACh, aby nedošlo ku svalovým kŕčom a následnej cholinergnej kríze vplyvom nadmerného nervového impulzu. ACh pôsobí svojim účinkom a inervuje žľazy, srdce, hladké svaly. Proces je v niečom podobný procesu hydrolýzy ACh. Takisto OP miera k aktívnemu miestu enzýmu AChE, kde Ser za pomoci His ako nukleofil napadne atóm fosforu a medzi OP a Ser sa tak vytvorí kovalentná väzba (Schéma 2). Vzniká tak pevný kovalentný konjugát, ktorý je veľmi stabilný a ten môže byť následne buď hydrolyzovaný spontánne alebo dealkylovaný tzv. ostarený (Bartosova, 2006). Starnutie enzýmu je stav vyjadrujúci trvalé zablokovanie enzýmu bez možnosti reaktivácie v tomto prípade AChE. Pojem ireverzibilné inhibítory AChE si OP vyslúžili kvôli starnutiu. Starnutie (dealkylácia) prebieha veľmi rýchlo, zatiaľ čo ich hydrolýza je veľmi pomalá a pri rýchlosti starnutia takmer nepozorovateľná (Patočka et al., 2004). Sila OP sa posudzuje podľa rýchlosti prechodu komplexu enzým – inhibítor na inhibovaný enzým. Keďže spomínaná hydrolýza tohto komplexu prebieha veľmi pomaly AChE nie je schopné ďalej si spĺňať svoju bežnú funkciu v organizme, čo predchádza kumulácii nervového impulzu na cholinergných synapsiách (Bajgar, 1991).

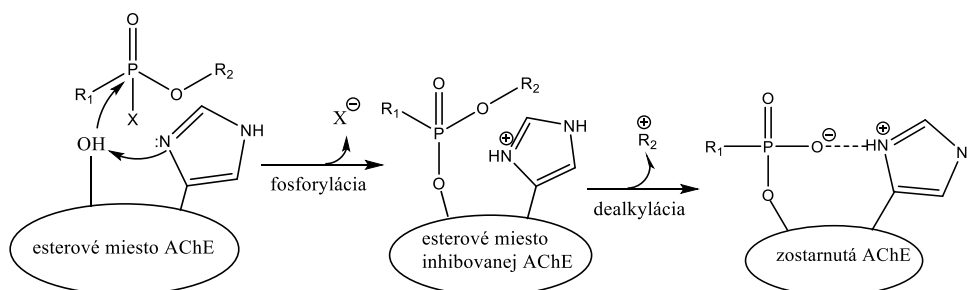


Schéma 2 Proces inhibície AChE
Zdroj: ChemDraw

2.3.5 Intoxikácia OP

OP spôsobujú toxicitu blokom enzýmu AChE. Výsledkom tohto bloku je nadmerná koncentrácia ACh na cholinergných synapsiách. Je to pre organizmus nepriaznivý stav, ktorý môže vyústiť do život ohrozujúcej cholinergnej krízy. Okrem tejto krízy rozlišujeme aj ďalšie príznaky otravy OP a to prechodný cholinergný syndróm a periférnu neuropatiu (Tattersall, 2018).

Za zmienenými zdravotnými stavmi stojí zložitý proces pôsobenia OP v organizme. V oblasti patofyziológie sa tento proces charakterizuje niekoľkými fázami. Začiatkom prvej fázy je vniknutie OP do krvného riečiska a jeho prechod ku enzýmu čiže na miesto jeho pôsobenia. V poradí druhou fázou je zvýšený výskyt neurotransmiteru ACh na nervových zakončeníach. Tieto dve fázy charakterizujú muskarínové príznaky, ktoré sa prejavujú vplyvom zvýšenej koncentrácie ACh na synapsiách vegetatívneho systému. Vyššie množstvo ACh na neuromuskulárnych platničkách vedie k excitácii nikotínových receptorov a tým aj k vyvolaniu nikotínových príznakov. Vplyvom nahromadenia ACh a mnohonásobnou stimuláciou jeho receptorov vznikne v CNS nerovnováha a ta vedie k príznakom centrálnym. Predposlednou treťou fázou sa označuje súbor biochemických, patofyziologických odchýliek zapríčinený pôsobením ACh na receptoch. Za štvrtú fázu sa považujú prejavy neskorej neurotoxicity (Bajgar, 1991).

Ako už bolo vyššie naznačené príznaky sa delia na muskarínové, nikotínové a centrálné.

Medzi **muskarínové** príznaky patria: očné prejavy (mióza, poruchy akomodácie), napadne potenie, slinenie a slzenie, bohaté prekrvená nosná sliznica, zvýšene vylučovanie hlienu v dýchacom trakte, sťah bronchov, poruchy močenia a vyprázdňovania (pozorovaná zvýšená peristaltika tráviaceho a močového traktu), bradykardia, nižší tlak (Bajgar, 1991).

Medzi **nikotínové** príznaky patria: fibrilácia, ochabnutie svalov neskôr klonicko – tonické kŕče svalov až postupne paralýza svalov. Najväčšie dôsledky sa spájajú so svalmi dýchacích ciest, ktoré postupne miera k úplnému ochrnutiu. Vzhľadom k tomu, že okrem paralýzy dýchacích svalov znemožňuje dýchanie aj nadmerná sekrécia hlienu a bronchokonstrikcia dýchanie je postupne takmer nemožné.

Medzi **centrálne** príznaky patria: depresie, zmätenosť, bezvedomie, emočná labilita úzkosť, nekľud, bolesti hlavy, depresia kardiovaskulárneho a dýchacieho centra v predĺženej mieche (Bajgar, 1991).

Akútny cholinergny stav začína miózou a následnou poruchou akomodácie, bolesťou očí a neskôr aj hlavy. Žľazy začínajú vylučovať nadmerne množstvo sekrétu. Cholinergná kríza pokračuje svalovými záškľbmi, stuhnutím, kŕčami až ochabnutím svalstva. Konečnou fázou tejto krízy sú tonicko – klonické kŕče až ochrnutie svalstva. K tejto fáze patri aj k smrti vedúca pľúcna insuficiencia spôsobená ochrnutím dýchacích svalov (Mika, 2011; Prymula et al., 2002; Lorke, 2019).

Bohužiaľ cholinergná kríza nekončí úplným vyliečením behom 1 až 4 dni bezprostredne po nej sa objavuje prechodný cholinergný syndróm. Prejavuje a svalovou slabosťou, hypoflexiou, ochrnutím bránice a dýchacích svalov abnormality kraniálnych nervov (Ganesan, 2010).

Príznaky otravy sa vyvíjajú v závislosti od spôsobu vniku OP do organizmu a od dĺžky expozície. Priama inhalácia spôsobuje rýchlejší priebeh intoxikácie a prejavy sú najmä pľúcne problémy a problémy s akomodáciou spolu s miózou. Taktiež centrálne prejavy sú tu veľmi výrazné. Pri perorálnom podaní sú zreteľnejšie gastrointestinálne prejavy. Podaním kožou trvá otrava najdlhšie, zvlášť dobre pozorovateľné sú tu centrálne a gastrointestinálne prejavy. Naopak mióza a dychové problémy zreteľne nie sú (Bajgar, 1985).

Po zasiahnutí organizmu OP sa behom pár dní objavujú ďalšie komplikácie. Nešpecifické komplikácie zahŕňajú poruchy homeostázy, srdečného rytmu, dýchania, funkcie obličiek . Keďže u OP sa preukázali aj účinky hepatotoxické, ich výskyt v organizme potvrdil zvýšene aktivity alaninaminotransferázy a aspartataminotransferázy naopak znížené množstvá sa preukázali u albumínu. V dôsledku oslabenia imunity sú taktiež pozorovateľné sekundárne infekcie.

Remisie otráv patria medzi špecifické komplikácie a vznikajú v dôsledku vyplavenia OP z tukových dep alebo sa uvoľňujú z väzieb na krvne bielkoviny. Je však možné, že sa menej toxicky OP v organizme procesom letálnej syntézy zmení na mnohonásobne toxickejší. Tento dej sa prejavuje stavom podobným cholinergnej kríze (Bajgar, 1985).

2.3.6 Inhibítory AChE ako predmet terapie

Podľa dĺžky trvania väzby sa reaktivátory delia na reverzibilne a ireverzibilne. Ako bolo už vyššie naznačené OP sú ireverzibilne inhibítory AChE. Reverzibilne inhibítory AChE sa používajú v terapii Alzheimerovej choroby, Parkinsonovej choroby, niektorých demencií, Myasthenia gravis, sú takisto súčasťou profylaxie NPL (Singh, 2013).

Alzheimerová choroba (AD) patrí medzi neurodegeneratívne ochorenia. Hlavné príznaky tejto choroby sú zhoršené poznávanie, pamäť, pozorovanie, časté zmeny nálad a neschopnosť učiť sa (Singh, 2013). U pacientov s AD bol spozorovaný znížený výskyt cholinergných neurónov a taktiež znížená funkcia ChAT v určitých oblastiach mozgu. Predpokladalo sa, že tieto javy spôsobujú poruchu pamäti a poruchy kognitívnych funkcií. Na tento popud začal výskum inhibítorov AChE, ktoré preukázali istú účinnosť (Pinto, 2011).

Parkinsonová choroba (PD) je podobne ako AD neurodegeneratívne ochorenie. Prejavuje sa poruchou hybnosti: porucha rovnováhy, tras, svalová stuhlosť, porucha jemnej motoriky atd. Okrem hybnosti sú pozorovateľné aj poruchy kognitívnych funkcií (Giacobini, 2004). Napriek faktu, že táto choroba postihuje najmä dopaminergné receptory bol zistený významný cholinergný deficit. Predmetom záujmu sa tak stali inhibítory AChE. Výsledky tejto terapie boli veľmi rôznorodé dokonca viedli k zisteniu, že po aplikácii inhibítorov AChE sa mierne zhoršili motorické funkcie. Niektorí autori článkov sa však s týmto zistením nestotožňujú (Karlson, 1981).

Myasthenia gravis (MG) je neurologické ochorenie prejavujúce sa neprimeranou únavou svalov po námahe. Je to z dôvodu poruchy spojov nervosvalových platničiek. MG je autoimunitné ochorenie, protilátky sa tvoria proti svalovým nikotínovým receptorom práve na nervosvalových platničkách. Tento proces vedie k zníženiu počtu ACh receptorov, vplyvom čoho v organizme vzniká cholinergná nerovnováha. Terapia sa snaží o znovu nastolenie cholinovej rovnováhy práve pomocou inhibítorov AChE. MG možno diagnostikovať pomocou krátkodobých inhibítorov AChE (Brenner, 2008).

Okrem týchto ochorení sa inhibítory AChE využívajú aj pri iných závažných ochoreniach ako napríklad pri miernych kognitívnych poruchách, demencií s Lewyho telieskami, vaskulárnej demencií, Downovom syndróme, Wernickeovom – Korsakovom syndróme, delíriách i migrénach atd. V týchto prípadoch sa inhibítory používajú z väčšej časti

ako aditívne liečivá, čiže nie sú to liečivá prvej voľby (Karlson, 1981). Medzi konkrétne látky používané v terapii sa radí donepezil, rivastridostigmín ktorý je liekom voľby u pacientov s AD (Pinto, 2011). Ako naznačujú predchádzajúce kapitoly inhibítory AChE sa stali veľmi prínosnou skupinou látok v zdravotníctve.

2.4 Reaktivátory AChE

Reaktivátory AChE, nazývané aj kauzálné antidotá napomáhajú urýchleniu vyviazania OP z enzýmu AChE, zamedzujú tým vzniku kovalentnej väzby medzi enzýmom a inhibítorom a zabezpečujú tak fyziologické chovanie tohto enzýmu. Ich účinok je však časovo obmedzený. Pokiaľ jedincovi antidotum nie je podané dostatočne rýchlo nastáva tzv. „starnutie enzýmu“, čiže stav, ktorý nemožno zvrátiť dodatočným podaním reaktivátora. Ide o proces dealkylácie kedy sa väzba AChE - OP stáva trvalou. Napriek neschopnosti kauzálnych antidot reaktivovať „zostarnutú väzbu“ sú liekom voľby u otráv spôsobených OP spolu s antikonvulzívnou a anticholinergnou terapiou (Patočka et al., 2004).

2.4.1 História reaktivátorov AChE

V roku 1950 Wilson preukázal, že hydroxylamín a nikotinhydroxaminová kyselina dokážu reaktivovať dietylfosforylovanú AChE. To viedlo k objavu, že oximy sú silné reaktivátory tohto enzýmu (Mercey et al., 2012).

Asi 5 rokov po tomto objave sa Wilsonovi podaril nasyntetizovať prvý monokvartérny reaktivátor AChE. Bol ním tzv pralidoxim (2-PAM), avšak nezávisle na Wilsonovi sa vo Veľkej Británii Albertovi Lawrence Greenovi a Danielovi Richard Daviesovi podaril uskutočniť ten istý výskum.(Petroianu, 2013; Petroianu, 2012).

Po syntéze pralidoximu sa hlavným cieľom stala snaha o zlepšenie reaktivačných schopností, čo viedlo k vzniku bispyridínových reaktivátorov (Doležal, 2016). V 60. rokoch 20. storočia sa podarilo popísať bispyridínový reaktivátor metoxim a keďže bol účinný pri liečbe mnohých otráv (sarin, cyklosarin a VX), na jeho základe boli neskôr syntetizované tzv. H-reaktivátory (HI-6, HI-7) (Musilek, 2011; Bajgar, 2016; Mercey et al., 2012). HI-6 bol prvá látka, ktorá dokázala reaktivovať AChE blokovanú somanom, ak bola podaná bezprostredne po otrávení (Malinák, 2018; Bajgar, 2007). Po objave H-reaktivátorov sa na prelome 20. a 21. začala na KTOX FVZ UO syntéza nových bispyridínových reaktivátorov. Označovala sa „K“(Kassa, 2008). Tieto tzv. „K“ oximy sú zatiaľ najnovšími látkami užívanými pri terapii OP otráv a stále prebieha ich výskum.

2.4.2 Štruktúra reaktivátorov AChE

Z chemickej stránky tieto látky zahŕňajú oximovú skupinu (R-CH=NOH), ktorá sa viaže na kvartérny dusíkový pyridinový kruh. Štruktúra reaktivátorov úzko súvisí s efektivitou a rýchlosťou hydrolýzy konjugátu inhibovaného enzýmu. Aby látka mohla pôsobiť ako reaktivátor AChE je nutne aby spĺňala niekoľko podmienok. Prvou podmienkou je prítomnosť kvartérneho dusíka, pomocou ktorého molekula získa afinitu k AChE (Patočka et al., 2004). Nenahraditeľnou podmienkou je prítomnosť oximovej skupiny resp. oximátového aniónu (R-CH=NO⁻). Táto skupina poskytuje silný nukleofil a tým pádom celú hydrolýzu uskutočňuje. Dôležitá je poloha tejto oximovej skupiny. Ak sa nachádza v polohe 3 pyridínového kruhu nevzniká oximátový anión a navyše ešte stericky bráni reaktivácii (Musilek et al., 2011; Bajgar et al., 2007; Worek, 2013). Polohy 2 a 4 sú na reaktiváciu vhodné dokonca bola zistená špecifita práve v závislosti na týchto polohách. Poloha 2 zabezpečuje ľahšiu inhibíciu somanu zatiaľ čo 4. poloha napomáha inhibícii tabunu (De Jong et al., 1989).

2.4.3 Členenie reaktivátorov AChE

Podľa množstva kvartérnych dusíkov v molekule reaktivátora AChE sa tieto látky delia na monopyridínové a bispyridínové (Balali-Mood, 2012).

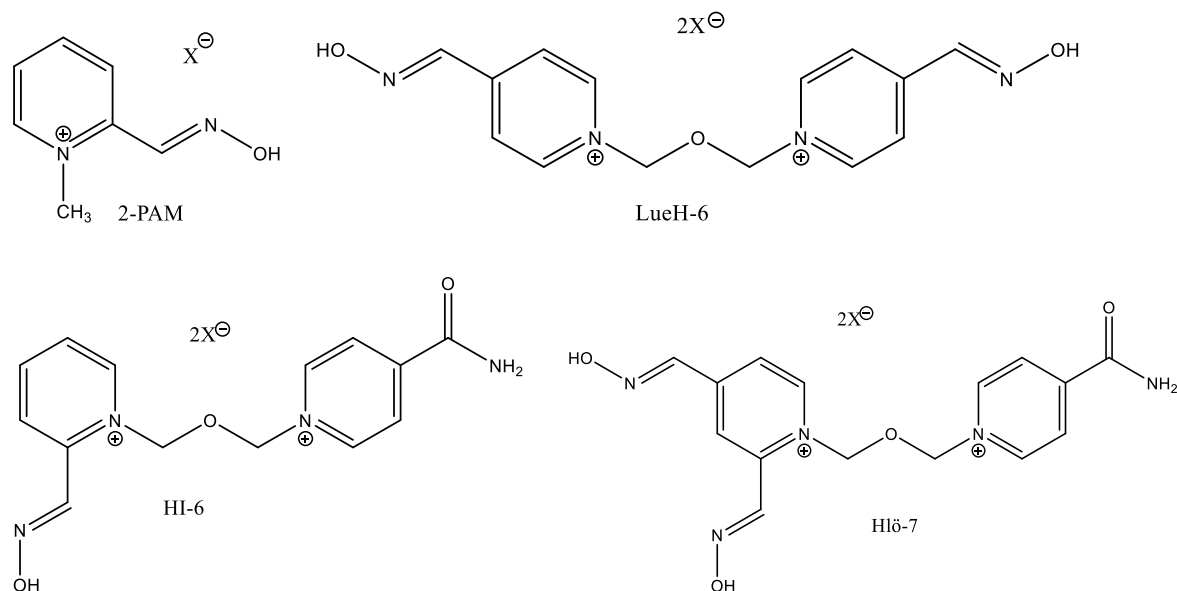
Monopyridínové reaktivátory

U vyššie spomínaného prvého nasyntetizovaného a popísaného pralidoximu (2-PAM) bol pozorovaný značný reaktivačný potenciál voči inhibovanej AChE. Látka s oximovou funkčnou skupinou v meta polohe (4-PAM) takisto reaktivovala spomínaný enzým ale menej účinne (Šepsová, 2013). Tieto látky boli síce prvé preskúmané, no neprejavujú ani zďaleka tak významné reaktivačné schopnosti v porovnaní s bispyridínovými reaktivátormi AChE (Musilek et al., 2011). Ba naopak sú najmenej účinné spomedzi komerčných oximov napriek tomu, že 2-PAM dostal pomenovanie "zlatý štandard" reaktivátorov (Bajgar, 2010). Tieto molekuly sú takisto znevýhodnené neschopnosťou prechádzať cez HEB, čo im umožňuje pôsobiť najmä v periférnom nervovom systéme (Eddleston, 2002).

Bispyridínové reaktivátory

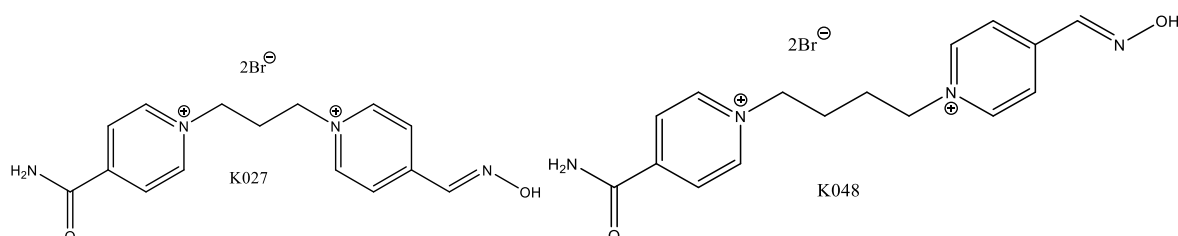
Molekuly bispyridínových reaktivátorov obsahujú dva atómy dusíka, čo je do istej miery výhoda aj nevýhoda. Výhodou je, že atómy dusíka viac priťahujú inhibovanú AChE ale zato je vďaka nim molekula polárnejšia, čo znemožňuje ich prechod cez HEB (Mercey et al., 2012). Pomocou spomínaných dusíkov je možné reagovať s dvoma anionickými časťami AChE

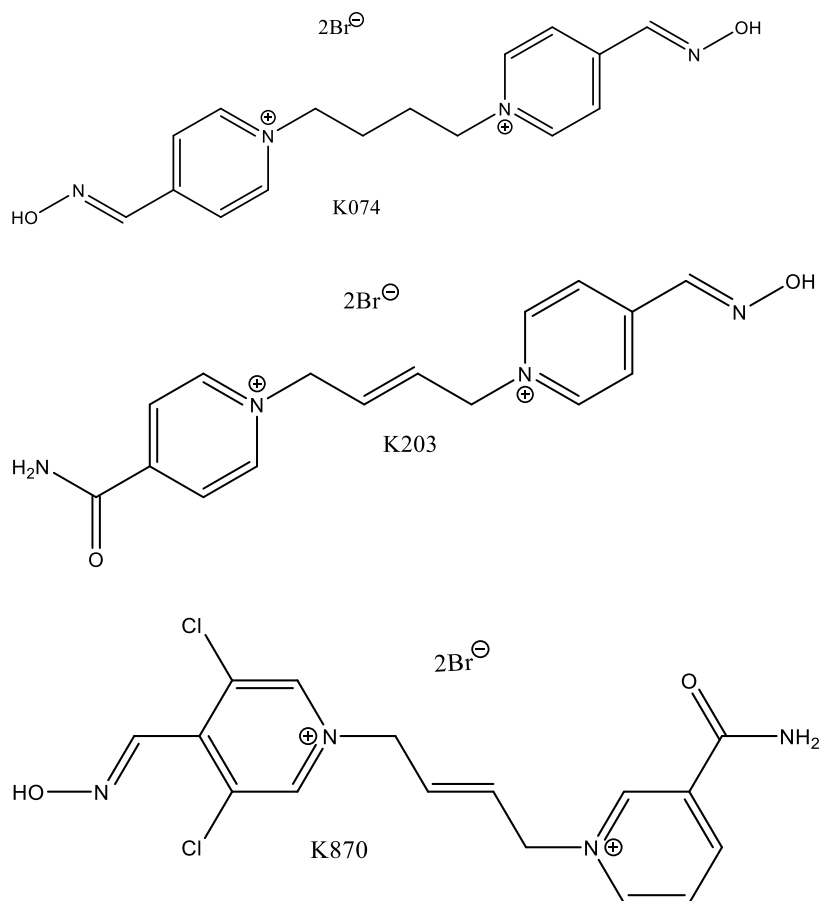
súčasne (Doležal, 2016). Názornú ukážku štruktúry mono- aj bispyridínových oximov ponúka obrázok 5.



Obrázok 5 Najvýznamnejšie mono- a biskvartérne reaktivátory AChE
 2-PAM (pralidoxim), LueH-6 (obidoxim), HI-6 (asoxim), HLö-7
 Zdroj: ChemDraw

Najnovšou skupinou bispyridínových oximov sú K-oximy. Tieto oximy sa delia na viacero generácií. Medzi prvú generáciu patria oximy K027 a K048 známe hlavne pre ich nízku toxicitu, čo im dáva schopnosť liečiť mnohé pesticídmi zapríčinené otravy (Kassa, 2017). Druhá generácia týchto látok má dlhý účinok reaktivácie ale sú značne toxické. Patrí do nej oxim s označením K074 a K075. Tretia generácia je významná najmä zlúčeninou K203, ktorá vznikla kombináciou látok druhej generácie, má nízku toxicitu kvôli prítomnosti karbamoylovej skupiny (Kuca et al., 2015). Je veľmi účinný a dokáže vyviazať z väzby na AChE aj tabun čo ukazuje na jeho veľký potenciál a reálnu šancu na uvedenie do bežnej praxe (Kassa, 2008). Štruktúry spomínaných K oximov sú znázornené na obrázku č. 6.





Obrázok 6 Základné štruktúry niektorých K-oximov
Zdroj: ChemDraw

2.4.4 Mechanizmus reaktivácie AChE

Ako je znázornené na schéme 3 oxim sa reaktivácie účastní vo forme zmieneneho oximátového aniónu. Oximátový anión sa svojim záporne nabitým kyslíkom naviaže na atóm fosforu v inhibovanom kofugáte a vyviaže ho z aktívneho miesta enzýmu, pri čom vznikne funkčný enzým a fosforylovaný oxim. Ak by proces reaktivácie neprebehol alebo nebol dostatočne rýchly, začal by samovoľný proces dealkylácie fosforylovej skupiny viazanej na Ser v aktívnom mieste enzýmu. Tento proces je bohužiaľ nenávratný a takýto enzým už nie je možné reaktivovať žiadnym oximom (Karasová, 2010). Jediná stratégia reaktivácie zostarnutého konjugátu je realkylácia in situ pomocou špecifických alkylujúcich činidiel (Mercey et al., 2012).

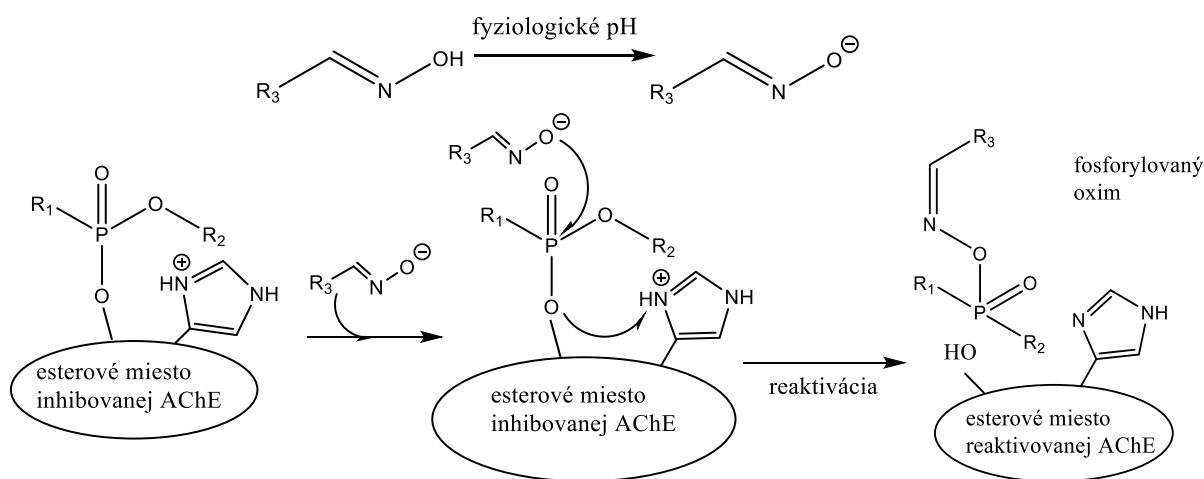


Schéma 3 Proces reaktivácie AChE
Zdroj: ChemDraw

2.4.5 Chemické vlastnosti reaktivátorov AChE

Reaktivátory AChE patria medzi hlavné molekuly používané v terapii otráv OP a cholinergných kríz. K terapii sa používa hlavne pyridinium aldoximová skupina (pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, HI-6, HLö-7). Vďaka vysokej nukleofilite oximy dokážu nahradiť väzbu Ser na fosfor v zlúčenine OP a tak navrátiť AChE jej pôvodnú funkciu. Počas 50 rokov výskumu chemici nasyntetizovali a otestovali veľké množstvo obmenených štruktúr monopyridínových a bispyridínových oximov. V posledných desaťročiach bol výskum smerovaný k bispyridínovým oximom ale všetky mali niekoľko nevýhod. Jednou z nich je neschopnosť prejsť HEB kvôli pozitívnemu náboju, ktorý nesú vo svojej molekule. Z toho dôvodu nemôžu účinne reaktivovať AChE v CNS. Niektoré z oximov tejto skupiny zase nedokážu účinne vyviazať širokú skupinu OP (Mercey et al., 2012).

Kvôli faktu, že AChE ma významné pôsobisko práve v CNS sa snaha vedcov upriamila na látky prechádzajúce HEB a na spôsoby transportu látok do CNS. Medzi účinne spôsoby transportu AChE reaktivátorov cez HEB patrí nanočasticový transport a inhibícia P-glykoproteínovej efluxnej pumpy. Chemické modifikácie zvyšujúce lipofilitu pyridinium aldoximov konkrétne pridanie atómu fluóru a nahradenie pyridinového kruhu dihydropyridínovým podporuje permeabilitu cez HEB taktiež. Glykozylácia týchto oximov zase umožňuje priepustnosť GLUT-1 transportným systémom transportujúcim glukózu (Mercey et al., 2012). Okrem štruktúry molekuly je k reaktivácii potrebná aj stabilita vodných roztokov oximov. Tejto podmienke nevyhovujú práve tzv. H-látky (HI-6 HLö-7...). Tieto oximy sa vyrábajú vo forme lyofilizátov (Kassa, 2002).

Schopnosť efektívne reaktivovať AChE závisí aj na rýchlosti akú je oxim schopný vyvinúť pri tomto deji. Doposiaľ žiaden oxim nie je dostatočne efektívny proti všetkým druhom OP. Všeobecne poňaté LüH-6 je najlepší pesticíd, HI-6 najlepšie reaktivuje AChE postihnutú sarinom a látkou VX avšak jeho nevýhoda je neschopnosť reaktivovať AChE inhibovanú tabunom. Komplex AChE – tabun dokáže reaktivovať látka TMB-4 zatiaľ najúčinnjšie (Mercey et al., 2012). HI-7 je potenciálny reaktivátor, ktorý má schopnosť reaktivovať soman, sarin aj tabun (Psočka et al., 2017).

2.4.6 Farmakokinetika reaktivátorov AChE

Reaktivátory sú podávané do organizmu intramuskulárne (i.m.). Zaručuje to rýchlu distribúciu a tým pádom rýchly nástup účinku (Karasová, 2010).

Účinok týchto molekúl sa sleduje na základe farmakokinetických parametrov: maximálnej koncentrácie (c_{max}) a času, za ktorý je tato koncentrácia dosiahnutá (t_{max}). Čo sa týka eliminácie jej rýchlosť nie je rovnaká u všetkých oximov a z 99% prebieha vylučovanie močom (Sidell, 1971).

2.5 Terapia intoxikácie OP

Tieto intoxikácie patria medzi veľmi závažné a dôležité je skrátiť čas expozície OP na organizmus čiže čo najrýchlejšie opustiť priestor zamorený spomínanými látkami. Po bezprostrednom opustení zamorených miest je treba tieto priestory dôkladne odmoriť. Zároveň je potrebné, aby bola okamžite zahájená prvá pomoc. V prípade užitia OP perorálne (p.o.) je nutný výplach žalúdka za prítomnosti aktívneho uhlia. Rozsah poškodenia organizmu závisí aj od rýchlosti podania špecifického antidota v prípade OP oximu a atropínu. Po opustení zamorených miest a po podaní antidota sa postupuje klasickou prvou pomocou, podľa stavu pacienta (stabilizovaná poloha v prípade bezvedomia, nepriama masáž hrudníka v prípade zástavy srdca a pod.) (Prymula R. et al., 2002).

Spomínané antidotum je potrebné podať rýchlo, kvôli starnutiu enzýmu AChE, ktorú OP inhibovali a spôsobili tým intoxikáciu. Antidotum pozostáva z anticholinergnej látky a z reaktivátora AChE. Je totižto nutné okrem obnovenia funkcie AChE takisto zmierniť účinky ACh, ktorý sa nahromadil v synaptickej štrbine (Kovarík, 2006).

Zástupcom anticholinergnej liečby je atropín. Snaží sa zabrániť ACh obsadzovať receptory napriek jeho nadmernému množstvu v ich okolí. Pôsobí najmä na muskarínových receptoroch a tým pádom znižuje svalové prejavy otravy. Kvôli neschopnosti prejsť cez HEB na centrálné príznaky nemá takmer žiadny vplyv. Atropín je pacientom podávaný až do prvých príznakov atropinizácie (bežne príznaky zdravého organizmu pozorované pri podaní atropínu).

Už z predošlých kapitol je známe, že medzi reaktivátory enzýmu AChE patria oximy. Známa je aj ich funkcia a to vyviazať látky typu OP, ktoré pôsobia ako inhibítory tohto enzýmu. Konkrétne sa v terapii užíva 2-PAM a obidoxim aj keď výskum umožnil syntézu mnoho účinnejších reaktivátorov pripravených na použitie (HI-6). Terapia pomocou týchto látok je síce účinná ale má aj svoje nevýhody. Nevýhodou je vlastná toxicita oximov a taktiež neschopnosť rozpúšťať sa. Voľba správneho reaktivátora závisí od konkrétneho OP, ktorý otravu spôsobil v prípade somanu, kde prebieha dealkylácia čiže starnutie enzýmu veľmi rýchlo je liečba veľmi náročná a takéto prípady sú len ťažko liečiteľné. Látky s najvyššou toxicitou čiže látky typu VX sa vyznačujú pomalou dealkyláciou preto je ich liečenie omnoho účinnejšie (Prymula et al., 2002). Keďže opakované podávanie oximov v prípade otráv NPL je veľmi rizikové, je nutné vykonať laboratórne testy. Konkrétne test reaktivovateľnosti erytrocytálnej AChE zo vzorky krvi organizmu postihnutého OP (Bajgar, 2004).

Ako doplnková terapia k terapii antidotami sa využíva antikonvulzívna liečba diazepamom, zameriavajúca sa na CNS. Konkrétne bráni nadmernej nervovej aktivite v mozgu čo by mohlo viesť k narušeniu mozgových štruktúr. Tieto záchvaty sa prejavujú tonicko – klonickými generalizovanými kŕčmi.

Ďalšia liečba závisí na príznakoch a spôsobe vniknutia OP do organizmu. V prípade vdýchnutia sa objaví pľúcna insuficiencia čo si vyžaduje oxygenoterapiu a podporu dýchania v podobe Syntophillinu. Dôležité je taktiež regulovať acidózu sodnou soľou bikarbonátu.

Čo sa týka podania, antidota sú vpravované do organizmu pomocou autoinjektorov. Bežne sa podávajú dva autoinjektory a to obidoxim spolu s atropínom k tomu spomínaná antikonvulzívna látka diazepam. Na užitie oximu HI-6 bol uspôsobený špeciálny mokro – suchý typ autoinjektoru práve kvôli jeho nestabilite v roztoku (Prymula et al., 2002).

3. Cieľ práce

Cieľom tejto diplomovej práce je pomocou modifikovanej Ellmanovej metódy vyhodnotiť schopnosť nového oximu K 870 vyviazať tabun z enzýmu AChE a obnoviť tak jeho fyziologické pôsobenie v organizme. Aktivita oximu bola meraná pomocou absorbancie vo vzorkách tkanív modelových organizmov, konkrétne v krvi, mozgoch a brániach potkanov. Výsledne hodnoty boli následne porovnávané so štandardmi.

4. Experimentálna časť

4.1 Príprava roztokov

- **Acetyltiocholin jodid (ATChJ)**

Podľa vzorca $c = \frac{m}{MV}$ bolo vypočítané, že výsledná koncentrácia zásobného roztoku ATChJ sa má rovnať 0,01 mol/l. Tento roztok bol rozdelený do 1 ml ependorfiek, ktoré boli uchovávané v mrazničke pri -12°C. Pred použitím bol obsah ependorfky zahriaty na izbovú teplotu a zriedený na objem 10 ml destilovanou vodou.

- **Cystein chlorid**

Zásobný roztok cystein chloridu mal výslednú koncentráciu 1 mmol/l. Tento roztok, podobne ako ATCh bol uchovávaný v chlade, pri teplote -12 °C a pred použitím ohriaty na izbovú teplotu.

- **Tris 0,1 M tlmivý roztok**

Tlmivý roztok bol pripravený za využitia slabej zásady, ktorú predstavoval 1,1,1- trishydroxymethyl-aminomethan. Je zrejme, že jeho pH bolo nutné upraviť na 7,6 pomocou kyseliny chlorovodíkovej (HCl). Tento zásobný roztok bol uchovávaný v sklenenej nádobe pri 4°C.

- **Tris 0,02 M tlmivý roztok**

Tento roztok bol pripravený z Tris 0,1 M tlmivého roztoku. Rovnako ako u predchádzajúceho tlmivého roztoku aj tento roztok bol uchovávaný v sklenenej nádobe pri teplote 4 °C.

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

K uskutočneniu experimentu bola potrebná výsledná koncentrácia DTNB 2,52 mmol/l. Roztok je svetlo citlivý. Nakoľko roztok na svetle ľahko stráca svoju štruktúru, je nutné pripravovať ho tesne pred zahájením reakcie a po dobu tejto reakcie skladovať v nádobe zakrytej alobalom.

4.2 Vybrané zvieratá

Ako laboratórne zvieratá v rámci tohto pokusu slúžili potkany kmeňa Wistar s váhou 330 ± 20 g. Zakúpene boli od dodávateľa Velaz (Praha, Česká republika). Miestom chovu bolo centrálné vivárium Fakulty vojenského zdravotníctva (Hradec Králové, Česká republika). K dispozícii mali štandardný pokrm pre hlodavce (Cerea Corp., Praha) a vodu ad libitum. Chovali sa za štandardných podmienok a to pri teplote 22 ± 2 °C a relatívnej vzdušnej vlhkosti 55 ± 6 %. Po týždennej aklimatizácii boli týmto potkanom odobraté vzorky. Tento dej prebiehal po schválení projektu pokusov Etickou komisiou Fakulty vojenského zdravotníctva ČR. (Hradec Králové, Česká republika). Všetky odbery a manipuláciu so zvieratami sprostredkoval personál Fakulty s osvedčením o spôsobilosti pracovať s laboratórnymi zvieratami podľa § 17odst. 1 zákona č. 207/2004 Zb., o ochrane, chove a využití pokusných zvierat.

4.3 Prístroje a pomôcky

Homogenizátor DI-25 Basic (IKA Werke, Nemecko)

Váhy Mettler Toledo AB204-S (Mettler Toledo International, USA)

Vortex Lab Dancer (IKA Staufen, Nemecko)

Spektrofotometer Helios Alpha (ThermoFisher Scientific, USA)

Zkumavky Safe-Lock (Eppendorf)

Špičky (Brand Wertheim)

Pipeta krokovacia Handy Step electronic (Brand Wertheim)

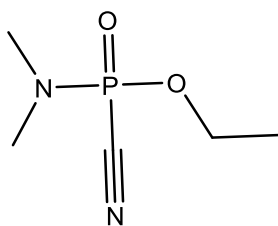
Microsoft Excel software (Redmont, WA, USA)

ChemDraw 19.0 (PerkinElmer, Massachusetts, USA)

GraphPad Prism 6.0 (USA)

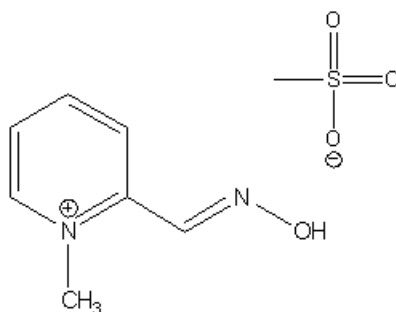
4.4 Chemikálie

Tabun – čistota 98 % zakúpený z Vojenského technického ústavu v Brne (Česká republika)



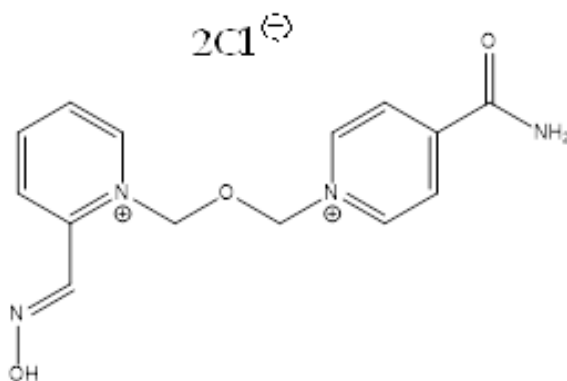
Obrázok 7 tabun
Zdroj: ChemDraw

Oximy: 2-pyridinaldoximetyl metánsulfonát (pralidoxim metánsulfonát),



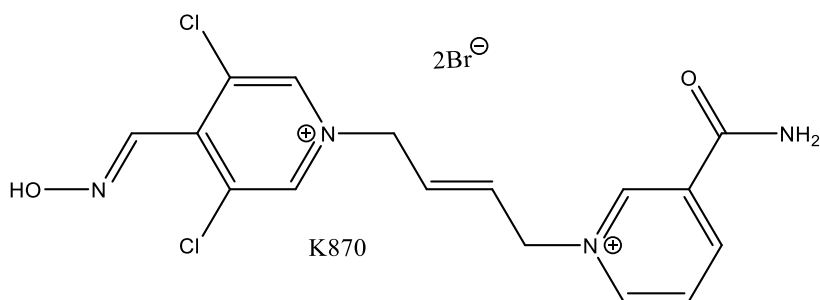
Obrázok 8 2-PAM (pralidoxim)
Zdroj: ChemDraw

4-karbamoyl-1-[(2-[(E)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium-1-yl)methoxy)methyl]pyridinium dichlorid (HI-6 dichlorid),



Obrázok 9 HI-6 (asoxim)
Zdroj: ChemDraw

1-((E)-4-(3-carbamoylpyridin-1-ium-1-yl)but-2-en-1-yl)-3,5-dichloro-4-((E)-(hydroxyimino)metyl)pyridin-1-ium (K 870)



Obrázok 10 Štruktúra oximu K 870
Zdroj ChemDraw

- reaktívatory AChE boli syntetizované na katedre toxikológie a vojenskej farmácie Fakulty vojenského zdravotníctva v Hradci Králové (Česká republika)
- čistota 96-99% bola overená štandardnými analytickými metódami a to pomocou HPLC techniky, detegovaná bola UV žiarením a na vyhodnotenie chromatogramov bol použitý software CSW Clarity 2.6.5.517 (DataApex, Praha, Česka republika)

Ostatné chemikálie – nakúpené od firmy Merck, (USA)

Na tento experiment bola taktiež využitá **destilovaná voda** získaná destiláciou na už spomenutej katedre Toxikológie a vojenskej farmácie Fakulty vojenského zdravotníctva.

4.5 Kalibrovanie prístroja

Pre prípadne vylúčenie nepresností je nutné spektrofotometer kalibrovať pred stanovovaním aktivity AChE.

Kalibrácia pomocou zásobného roztoku cysteinu mala nasledovný priebeh: 5 μl zásobného roztoku cysteinu o koncentrácii 1 mmol/l bolo zriedených 995 μl destilovanej vody v ependorfke. Následne bolo odobraných 500 μl takto pripraveného roztoku a pridaných 500 μl destilovanej vody. Toto riedenie bolo uskutočnené celkovo 3-krát za vzniku 4 rôznych koncentrácií (1 mmol/l; 0,5 mmol/l; 0,25 mmol/l; 0,125 mmol/l). Po každom riedení bolo nutné ependorfky riadne pretrepať v trepačke a keďže sa koncentrácia jednotlivých roztokov znižovala bolo nutné meniť špičky pipiet.

Riedenie	Destilovaná voda [μl]	Roztok cysteinu [μl]	Výsledná koncentracia roztoku [mmol/l]
1.	995	5 zásobného roztoku	1
2.	500	500 z predošlého roztoku	0,5
3.	500	500 z predošlého roztoku	0,25
4.	500	500 z predošlého roztoku	0,125

Tabuľka 7 Riedenie kalibračných roztokov cysteinu

Pred začiatkom samotnej kalibrácie bola okrem riedenia cysteinu taktiež pripravená zmes DTNB a 0,1 M Tris tlmivého roztoku v pomere 1:4.

Na základe jednotlivých koncentrácií cysteinu bola zostrojená kalibračná krivka (závislosť absorbancie na koncentrácii). Graf kalibračnej krivky začínal bodom [0,0] kedy bolo do oboch kyviet napipetovaných 1,7 ml už spomínanej zmesi DTNB a 0,1 M Tris tlmivého roztoku a 300 μl destilovanej vody. Ostávajúce body grafu vznikli nameraním hodnôt absorbancie zmesi v tomto zložení :1,7 ml zmes DTNB a 0,1 Tris tlmiveho roztoku, 100 μl destilovanej vody a 200 μl daného predpripraveného roztoku cysteinu. Tento proces bol prevedený so všetkými roztokmi cysteinu. Postupovalo sa od najnižšej koncentrácie po najvyššiu. Pred vložením kyviet do spektrofotometra bol ich obsah poriadne premiešaný. Hodnoty absorbancie boli merane pri vlnovej dĺžke 436 nm.

Konečná kalibračná krivka bola výsledkom priemerných hodnôt absorbancií z dvoch meraní jednotlivých kalibračných roztokov.

4.6 Ellmanova metóda

Podstatou tejto metódy je meranie cholinesterazovej aktivity pomocou acetylthiocholínu. Táto metóda má široké využitie v mnohých oblastiach. Okrem iného je využívaná k stanoveniu miery reaktívácie enzýmov cholinesteráz po ich blokácii inhibítormi. Takisto je užitočná v poľnohospodárstve, kde sa s jej pomocou určuje miera intoxikácie insekticídmi karbamátovej a organofosfátovej povahy. Jedným z ďalších využití je určenie efektivity liečby u pacientov s Alzheimerovou chorobou a inými ochoreniami cholinergnej povahy napríklad Myasthenia gravis, familiárna amyotrofická laterálna skleróza (fALS). Metóda je takisto známa prijateľnou cenou, nenáročnosťou a presnosťou.

4.6.1 Princíp metódy

Princíp tejto metódy spočíva v hodnotení reaktívovanej acetylcholinesterázy v tkaní zvierat a to pomocou acetylthiocholínu. Táto látka je štruktúrne podobná acetylcholínu. Acetylthiocholin je rozkladaný vyššie zmieneným enzýmom acetylcholinesterázou za vzniku kyseliny octovej a tiocholínu – látky s voľnou tiolovou skupinou. Činidlom pre detekciu tiolových skupín je tzv. Ellmanovo činidlo, alebo kyselina 5'5-ditiobis-2-nitrobenzoová. DTNB reaguje s tiocholínom následkom čoho dôjde k rozštiepeniu disulfidickej väzby, pričom vznikajú dva produkty, z ktorých jeden, 2-nitro-5-tiobenzoat, absorbuje elektromagnetické žiarenie o dĺžke 412 nm, je teda detekovateľný spektrofotometricky. Intenzita signálu detektoru je úmerná koncentrácii reaktívovanej AChE vo východnom vzorci.

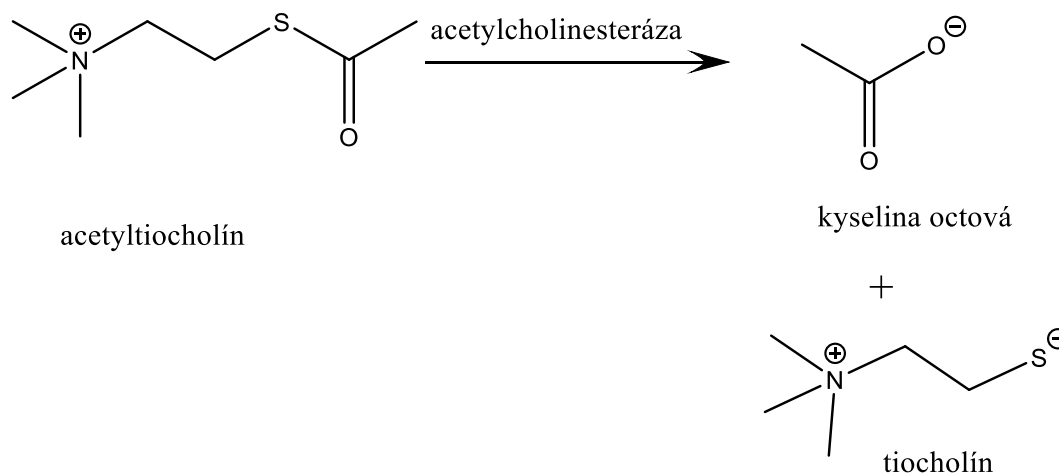


Schéma 4 Rozštiepenie acetylthiocholínu AChE na kyselinu octovú a tiocholín.
Zdroj: ChemDraw

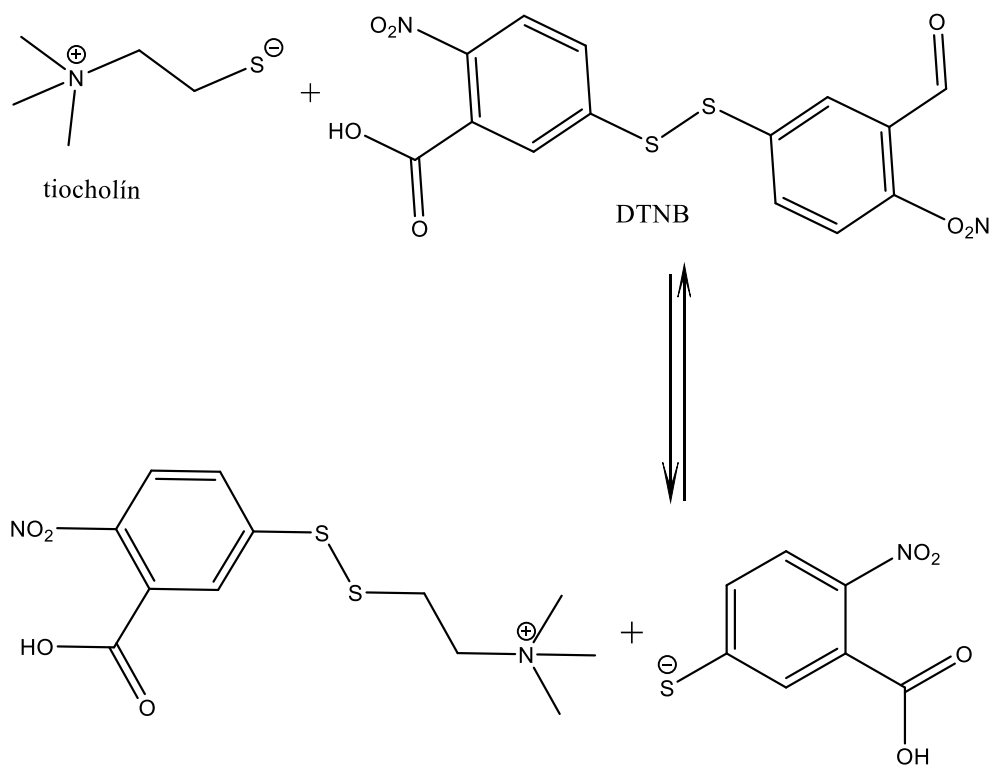


Schéma 5 Štiepene S-S mostíkov a väzba tiocholínu na DTNB
Zdroj: ChemDraw

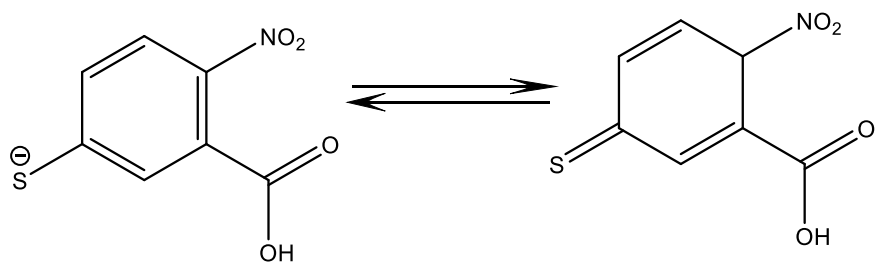


Schéma 6 Konjugácia dvojitych väzieb kyseliny 2-merkaptó-2-nitrobenzoové.
Zdroj: ChemDraw

4.7 Postup stanovenia miery reaktivácie AChE oximom

Predmetom tohto experimentu bolo stanovenie miery reaktivácie AChE v krvi, mozgu a bránici modelových organizmov, v tomto prípade potkanov, na základe ich absorbancií.

4.7.1 KRV

V deň merania bola zvieratám odobraná krv. Tá bola následne napipetovaná do ependorfiek. Ependorfky boli označene číslami, ktoré predstavovali 5 testovacích skupín (tabuľka 8). Každá skupina obsahovala 8 vzoriek odobratých 8 rôznym potkanom.

Do pripravenej skúmavky bolo k 1,9 ml 0,02 M Tris tlmivého roztoku pridaných 100 μ l vyššie zmienenej heparinizovanej krvi z ependorfky. Obsah skúmavky bol dôkladne premiešaný v trepačke a následne ponechaný k rozjasneniu. Takto bola pripravená testovacia vzorka krvného hemolyzátu. Reakcia začala v kyvete pridaním roztoku DTNB, krvného hemolyzátu a ATCh. K odmeraniu presnej hodnoty absorbancie bolo nutné obsah kyvety premiešať. Po umiestnení kyvety do spektrofotometra bola pri vlnovej dĺžke 436 nm a teplote 25 °C premeraná príslušná hodnota absorbancie vzorku. Celý proces prebiehal po dobu 5 minút. Vzorky bolo nutné merať 2-krát a v prípade potreby viac krát.

Skupina č. 1	fyziologický roztok, po 1 minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 2	tabun (LD ₅₀ =200 μ g/kg), po minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 3	tabun (LD ₅₀ =200 μ g/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), HI-6 dichlorid (81mg/kg)
Skupina č. 4	tabun (LD ₅₀ =200 μ g/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), pralidoxim metánsulfát (197 mg/kg)
Skupina č. 5	tabun (LD ₅₀ =200 μ g/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), K 870 (100mg/kg)

Tabuľka 8 Látky podané jednotlivým skupinám vzoriek krvi

4.7.2 BRÁNICA

Po odobratí boli jednotlivé bránice uchovávané pri teplote -20 °C. Zmrazené bránice, uložené v Petriho miskách, boli označené číslami, ktoré predstavovali 5 testovacích skupín (tabuľka 9). Každá skupina obsahovala 8 vzoriek odobratých práve tým 8 potkanom, ktorým bola predtým odoberaná krv.

Aby riedenie vzoriek odpovedalo pomeru 1:9 bolo nutne zväžiť hmotnosť jednotlivých bránic. Vzorky boli zriedené 0,02 M Tris tlmivým roztokom. Vzniknutá zmes bola následne dôkladne zhomogenizovaná na rovnorodú kvapalinu. Ďalší postup bol analogicky ako u krvi: kyveta sa naplnila roztokom DTNB, homogenizátom bránice a ATCh. Obsah kyvety bol premiešaný a vložený do spektrofotometra. Meraná bola hodnota absorbancií jednotlivých vzoriek pri vlnovej dĺžke 436 nm a teplote 25 °C po dobu 10 minút. Aj v tomto prípade bolo nutné uskutočniť 2, prípadne viac meraní.

Skupina č. 1	fyziologický roztok, po 1 minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 2	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 3	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), HI-6 dichlorid (81mg/kg)
Skupina č. 4	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), pralidoxim metánsulfát (197 mg/kg)
Skupina č. 5	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), K 870 (100mg/kg)

Tabuľka 9 Látky podané jednotlivým skupinám vzoriek krvi

4.7.3 MOZOG

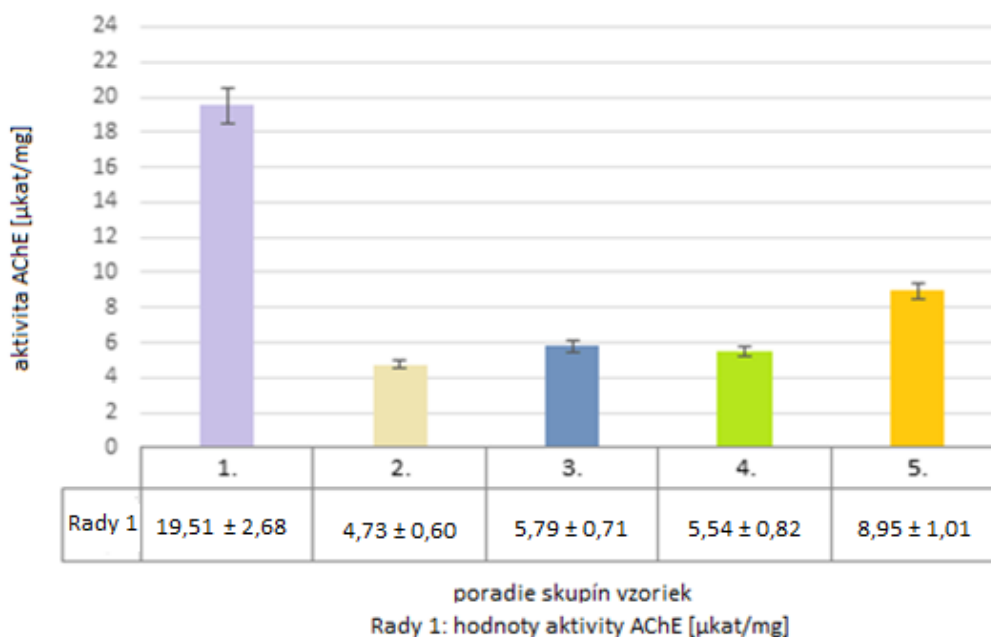
Na experiment boli použité odobrané zvieracie mozgy uložené v Petriho miskách, skladované pri teplote -20 °C. Petriho misky boli takisto označené číslami 5 testovacích skupín (tabuľka 10). Každá skupina obsahovala 8 vzoriek získaných z 8 potkanov, o ktorých pojednávajú predchádzajúce kapitoly.

Analogicky s bránicou boli jednotlivé mozgy zvážené a zriedené 0,02 M Tris tlmivým roztokom v pomere 1:9. Po predchádzajúcej homogenizácii bola kyveta naplnená roztokom DTNB, homogenizátom a ATCh. Po premiešaní a následnom vložení kyvety do spektrofotometra bola premeraná hodnota absorbancie pri vlnovej dĺžke 412 nm. Vzorky boli merane 3 minúty. Ako v ostatných prípadoch aj tu sa vzorky merali 2, poprípade viac krát.

Skupina č. 1	fyziologický roztok, po 1 minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 2	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 3	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), HI-6 dichlorid (81mg/kg)
Skupina č. 4	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), pralidoxim metánsulfát (197 mg/kg)
Skupina č. 5	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), K 870 (100mg/kg)

Tabuľka 10 Látky podané jednotlivým skupinám vzoriek krvi

Krv - aktivita AChE



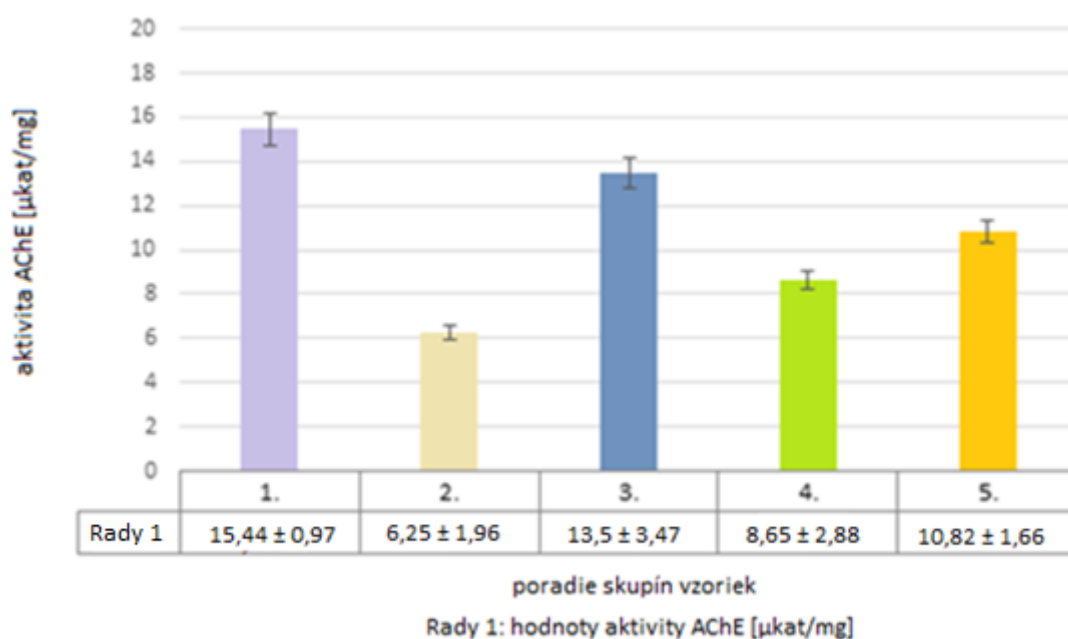
Graf 1 Hodnoty aktivít AChE jednotlivých skupín vzoriek krvi
Zdroj: Microsoft Excel

Skupina č. 1	fyziologický roztok, po 1 minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 2	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 3	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), HI-6 dichlorid (81mg/kg)
Skupina č. 4	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), pralidoxim metánsulfát (197 mg/kg)
Skupina č. 5	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), K 870 (100mg/kg)

Tabuľka 8 Látky podané jednotlivým skupinám vzoriek krvi

Aktivita AChE pri podaní fyziologického roztoku dosiahla hodnotu $19,51 \pm 2,68$ µkat/mg. Graf 2 ukazuje, že nový, testovaný oxim K 870 reaktivoval AChE najúspešnejšie spomedzi oximov, jeho percento reaktívácie bolo **29%** čo odpovedá aktivite $8,95 \pm 1,01$ µkat/mg. Reaktíváciou oximom HI-6 dosiahla AChE aktivitu $5,79 \pm 0,71$ µkat/mg a reaktívacie percento **7%**. Pralidoxim reaktivoval AChE najmenej ($5,54 \pm 0,82$), v prepočte na percento reaktívácie dosiahol **6%**.

Bránica - aktivita AChE



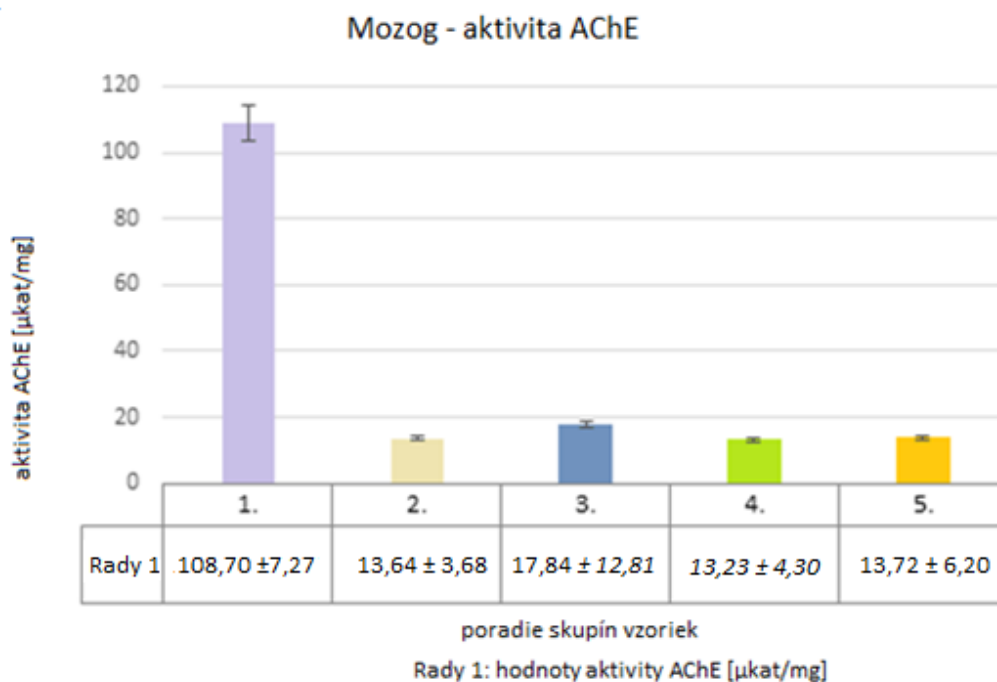
Graf 2 Hodnoty aktivít AChE jednotlivých skupín vzoriek bránic

Zdroj: Microsoft Excel

Skupina č. 1	fyziologický roztok, po 1 minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 2	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 3	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), HI-6 dichlorid (81mg/kg)
Skupina č. 4	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), pralidoxim metánsulfát (197 mg/kg)
Skupina č. 5	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), K 870 (100mg/kg)

Tabuľka 9 Látky podané jednotlivým skupinám vzoriek bránic

Fyziologická aktivita AChE je $15,44 \pm 0,97$ µkat/mg. Graf 1 jasne znázorňuje, že AChE najúčinnšie reaktivoval oxim HI-6 dichlorid ($13,5 \pm 3,47$ µkat/mg) čo odpovedá percentu reaktivácie **79 %** a najmenej účinný bol pralidoxim metánsulfát ($8,65 \pm 2,88$ µkat/mg) s percentom reaktivácie **26 %**. Aktivita testovaného oximu K 870 s percentom reaktivácie **50 %** bola $10,82 \pm 1,61$ µkat/mg. Znamená to, že tento oxim je schopný reaktivácie nie však do takej miery ako HI-6.



*Graf 3 Hodnoty aktivít AChE jednotlivých skupín vzoriek mozgov
Zdroj: Microsoft Excel*

Skupina č. 1	fyziologický roztok, po 1 minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 2	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg)
Skupina č. 3	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), HI-6 dichlorid (81mg/kg)
Skupina č. 4	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), pralidoxim metánsulfát (197 mg/kg)
Skupina č. 5	tabun (LD ₅₀ =200 µg/kg), po minúte atropín (10 mg/kg), K 870 (100mg/kg)

Tabuľka 10 Látky podané jednotlivým skupinám vzoriek mozgov

Je zrejmé, že aktivita AChE v mozgu je veľmi vysoká ($108,70 \pm 7,27 \mu\text{kat/mg}$), keďže práve mozog je hlavným miestom jej pôsobenia. Z grafu je však očividné, že oximy nie sú schopné riadne enzým reaktivovať. Je to z dôvodu ich prílišnej polarita a tým pádom neschopnosti prejsť HEB. Aktivita AChE dosiahla pri reaktivácii oximom HI-6 hodnotu $17,84 \pm 12,81 \mu\text{kat/mg}$, čiže **4 %** v prepočte na reaktivačné percento. Schopnosti reaktivácie AChE pralidoximu boli $13,23 \pm 4,30 \mu\text{kat/mg}$ čo je reaktivačné percento - **0,04 %** a oxim K 870 ($13,72 \pm 6,20 \mu\text{kat/mg}$) s reaktivačným percentom **0,08 %** sa až tak výrazne nelíšili.

6. Diskusia

Enzým AChE hrá dôležitú úlohu v centrálnej aj periférnej nervovej sústave a preto je jeho ireverzibilná blokácia za fyziologického stavu nebezpečná a nežiadúca. Keďže látky akými sú OP túto blokáciu spôsobujú, je nutné zabrániť ich užívaniu (Patočka et al., 2004). Napriek preukázanému nebezpečenstvu OP, mnohé prípady z minulosti nasvedčujú ich zneužívaniu a to na vojenské, či teroristické účely (Marrs et al., 2007; Pletcher, 2010). Z tohto dôvodu výskum smeroval k syntéze látok, ktoré by účinok OP zvrátili. Keďže doteraz nebolo nasyntetizované širokospektrálne antidotum s uspokojujivými výsledkami reaktivácie, pozorujeme stálu snahu vedcov o syntézu nových reaktivátorov AChE (Kuca et al., 2004).

K terapii intoxikácií OP, ktoré spôsobujú blokáciu AChE, patrí okrem špecifických antidot (oximov) aj antikonvulzívna liečba v podaní diazepamu a anticholinergná liečba prezentovaná atropínom. Atropín ako zástupca anticholinergnej liečby pomáha zvrátiť účinky nahromadeného ACh na muskarínových receptoroch po blokácii AChE a diazepam má za úlohu zmierniť kŕče, keďže atropín na nikotínové receptory nepôsobí. (Prymula R. et al., 2002). Reaktivátory (špecifické antidotá) sa používajú kvôli vyviazaniu OP z väzby na enzým AChE ale ich účinok je obmedzený. Veľmi významné, zďaleka nie jediné obmedzenie spočíva vo vysokej vnútornej toxicite oximových reaktivátorov. Ďalším obmedzením je už zo štruktúry patrná vysoká polarita týchto látok a tak nikoho neprekvapí nedostatočná schopnosť prieniku cez HEB do mozgu. Problém spôsobuje fakt, že práve tam koncentrácia AChE dosahuje najvyššie hodnoty. Jedným z ďalších nevýhod tejto skupiny je špecifita antidot k typu inhibítora. Zatiaľ sa nepodarilo nájsť žiadne širokospektrálne antidotum, ktoré by pôsobilo na všetky inhibítory súčasne. Nevýhodou je aj proces starnutia väzby medzi AChE a OP, kedy nie je možné nereverzibilný inhibítor viac z väzby vyviazať. Rýchlosť starnutia enzýmu závisí na chemickej štruktúre OP a z toho dôvodu tu hlavnú úlohu zohráva čas,

Medzi látky prvej voľby teda jednoznačne patria oximy. Jedným z najstarších oximov je pralidoxim s kódom K 160. Jeho účinky sú v porovnaní s oximom HI-6 veľmi malé aj z dôvodu jeho chemickej štruktúry. Podľa nej patrí medzi monopyridínové zlúčeniny, čo jasne naznačuje nižšiu afinitu k AChE, kvôli prítomnosti jediného kvarterného dusíka (Mercey et al., 2012). Najlepšie výsledky doposiaľ podáva oxim HI-6 zo skupiny bispyridinových zlúčenín no nedostatkom tejto skupiny je ako bolo už vyššie uvedené vysoká polarita a tým pádom aj

znižený prechod cez HEB. Slabé miesto oximu HI-6 je taktiež tabun a niektoré ďalšie pesticídy ktorých blokáciu nedokáže dobre reaktivovať (Bajgar, 2004).

Kvôli doterajšej márnej snahe o syntézu vysokoúčinného antidota voči AChE inhibovanej tabunom, bol na KTVF nasyntetizovaný oxim K 870, do ktorého boli vkladané nemalé nádeje. Dôvod, prečo vedci vkladali nádeje práve do molekuly K 870 je jasný. Základ molekuly je inšpirovaný doposiaľ najúčinnjšími „K“ oximami s jednou neoximovou a jednou oximovou skupinou v polohe para na pyridínoch. Neoximová skupina tvorí vodíkové mostíky ale nie je priamou reaktivačnou skupinou. Zvyšuje afinitu oximu k enzýmu (Musílek et al., 2007). Takisto má testovaný oxim so skupinou „K“ oximov podobnosť v 4C reťazci spájajúcom pyridíny (Woreket al., 1996). Na štruktúre molekuly oximu K 870 je jasne badateľná dvojité väzba, ktorú obsahuje substancia K 203. Práve táto substancia sa vyznačuje schopnosťou dobre reaktivovať inhibíciu tabunom. Dvojité väzba dáva štruktúre schopnosť rigidity pri interakcii s aktívnym miestom enzýmu (Kuca et al., 2006). Niektoré štúdie (Kassa et al., 2007) významnosť dvojitej väzby pri reaktivácii však naopak zamietajú. Čím sa náš oxim od substancie K 203 nápadne líši, sú dva atómy chlóru na jednom z pyridínových jadier. O prínose chloridácii oximov pojednáva štúdia Zorbaz, 2018. Predpokladalo sa, že vďaka dvom lipofilným atómom chlóru, ktoré sú substituované na jednom z pyridínových jadier oximu K 870 bude spomínaný oxim schopný prechodu cez HEB. Výsledky tejto štúdie však tvrdia opak.

Keďže hodnotenia nasyntetizovaného oximu K 870 sa javili prinajmenšom veľmi sľubne, podnietilo to *in vivo* testovanie, ktorého výsledkom je táto práca. Ako modelové organizmy boli pri tomto experimente použité potkany. Pri štúdiu účinnosti oximov bývajú porovnávané hodnoty reaktívacie AChE v krvi týchto zvierat, ktorá je pri intoxikácii prvým zasiahnutým orgánom. Ďalším dôležitým orgánom je bránica a to z toho dôvodu, že tento sval je jedným z dýchacích svalov a jej paralýza, ktorú OP spôsobujú je životu nebezpečná. Je tým pádom jasné, že prebieha snaha zistiť mieru reaktívacie antidot aj v tomto orgáne. Aby sme zistili, či je testovaný reaktívator schopný prestupu HEB, je potkanom odoberaný aj mozog (Bajgar, 1991).

Ako štandardy vhodné na porovnanie slúžili dichlorid oximu HI-6 a pralidoxim metánsulfát. Pri meraní takisto nutné počítať s určitými odchýlkami spôsobenými genetickým základom potkanov. Aby sme tieto genetické odchýlky vylúčili, použili sme skupinu s väčším počtom zvierat.

Ako bolo už spomenuté, zatiaľ nebol nájdený žiaden oxim, ktorý by fungoval na všetky typy otráv spôsobených NPL. Problémovou substanciou je práve testovaný tabun, ktorý je reaktivovateľný len malou skupinou látok oximovej povahy. Jedným zo štandardných oximov patriacich do výbavy mnohých armád ako antidotum proti tabunu je obidoxim. Žiaľ jeho účinky nie sú dostatočné, čo podnecuje snahu nachádzať nové reaktivátory AChE inhibovanej tabunom (Kassa, 2002). Ďalšou látkou uspôsobenou na tento účel je oxim K 203. Tento oxim síce dosahuje pri inhibícii tabunom veľmi dobré výsledky, (Karasová et al. , 2009) avšak ako antidotum pri otrave sarinom percento reaktívácie poukazuje na nedostatočnú mieru reaktívácie (Kassa et al., 2011).

Štúdia Karasová et al., 2009 preukázala percento reaktívácie oximu K 203 24 % vo vzorkách krvi. Oxim K 870 testovaný našim výskumom dosiahol percento reaktívácie v krvi 29 %. Tento fakt naznačuje, že oxim K 870 sa preukázal ako dobrý inhibítor AChE v krvi. Je obecné známe že oxim HI-6 nie vhodným antidotom pri otrave tabunom preto percento reaktívácie 7 %, podobné pralidoximu 6 % neprekvapilo. Oxim HI-6 je však veľmi dobrým reaktivátorom pri otrave sarinom, kde dosahuje percento reaktívácie vo vzorkách krvi 96 % (Mackurová, 2018).

Zo zmienenej štúdie Karasová et al., 2009 vyplýva, že oxim K 203 dosiahol v mozgu percento reaktívácie AChE 10 %, čomu sa oxim K 870 vôbec nepriblížil ba dokonca u neho nebola badateľná žiadna reaktívacia. Na základe toho sa dá predpokladať, že sa do mozgu vôbec nezostal. Tento fakt je však nutné overiť ďalším experimentom. Vďaka dvom chlóróm v molekule oximu K 870 bol očakávaný lepší výsledok, keďže chlór významne zvyšuje lipofilitu molekúl. U pralidoximu sa v nami nameraných hodnotách (-0,04 %) neobjavila žiadna reaktívacia. Oxim HI-6 reaktivoval AChE vo vzorkách mozgov najlepšie z nami skúmaných oximov. Aktivita AChE sa po jeho podaní zvýšila o 4 %. Tento výsledok žiaľ taktiež nie je uspokojivý a nedá sa porovnať s reaktíváciou AChE po použití sarinu. HI-6 je totižto schopný reaktivovať AChE v mozgu blokovanú sarinom až o 45 % (Kassa, 2014).

Čo sa bránice týka, predmet tohto experimentu a to oxim K 870 mal veľmi uspokojivé výsledky, až 50 %, zatiaľ čo oxim K 203 prezentovaný štúdiou Kassa, 2011b) dosiahol zvýšenie aktivity AChE v bránici len 14 %. Oxim HI-6 dosiahol vo vzorke bránic veľmi vysoké percento reaktívácie až 79 %, čo odpovedá jeho schopnosti reaktivovať AChE v bránici inhibovanú sarinom (Mackurová, 2018). Pralidoxim reaktivoval AChE vo vzorkách bránic s percentom reaktívácie 26 %.

Bajgar, 2004 vo svojom článku uvádza, že reaktivačné percento nutné pre záchranu organizmu po expozícii NPL je 5-10 %. Podľa tohto faktu je možné konštatovať, že testovaný oxim K 870 účinkuje proti tabunu ako antidotum len na periférnej úrovni avšak v mozgu, kde je koncentrácia enzýmu AChE najvyššia nie je dostatočne účinný. Potvrdilo sa tvrdenie autorov, že oxim HI-6 je selektívny a nie je vhodné liečiť ním tabunom spôsobenú otravu. U pralidoximu sa potvrdila téza, že bispyridínové deriváty sú vhodnejšie na terapiu otráv než monopirydínové (Mercey et al., 2012).

Reaktivátor K 870 sa už v minulosti podrobil testovaniu in vivo. Svedčia o tom aj výsledky práce Mackurová, 2018 kde bol tento oxim vystavený inhibičnému pôsobeniu sarinu. V tomto prípade si testovaná substancija viedla viditeľne lepšie. V krvi dokázala zvýšiť aktivitu AChE o 24 % oproti inhibovaným vzorkám, v mozgu o 8 % a vo vzorkách bránice o 50 %, čo sa rovná reaktivácii voči tabunu skúmanému v našom experimente. Ako je vidieť oxim K 870 v tomto prípade spĺňa Bajgarov, 2004 limit na prežitie organizmu po otrave NPL. V spomínanej práci (Mackurová, 2018) je badateľné, že oxim HI-6 značne percentuálne prevyšuje reaktivačnú schopnosť substancie K 870 a preto nie je dôvod aby ho nahradil. O reaktivačných schopnostiach oximu K 870 reaktivovať sarin pojednáva aj štúdia Kassa, 2018.

Takisto ako AChE aj BChE je predmetom testov a experimentov. Štúdia Zorbaz, 2019 sa venovala reaktivácii BChE blokovanej NPL, kde úlohu reaktivátorov zohrávajú chlóróvé deriváty bispyridínových oximov, čiže aj oxim K 870. Štúdia predkladá fakt, že najlepšie je reaktivovateľná BChE blokovaná sarinom. Porovnateľne dobre reaktivovateľné boli prípady blokácie VRX a cyklosarinom. BChE inhibovaná tabunom dosahovala najnižšie percento reaktívácie po pôsobení reaktivátorov, kvôli sterickému bráneniu väzby tabunu na BChE. Oxim K 870 dosiahol najvyššie percento reaktívácie u sarinu, čo sa zhoduje s výsledkami, ktoré tento oxim dosahoval u AChE. Dobre si oxim K 870 viedol aj pri reaktívácii BChE blokovanej substanciou VRX, zatiaľ čo tabun nebol schopný reaktivovať vôbec. Spomínaná štúdia ukázala, že testovaný oxim K 870 alebo schopný po inhibícii tabunom reaktivovať ako enzým AChE tak ani enzým BChE (Zorbaz, 2019).

K cieľu, o ktorý sa snaží výskum antidot pre NPL vedie nejedna cesta. Jednou z možností je kombinácia oximov s rôznymi spektrami účinku. Tým by sa odstránila nevýhoda prílišnej špecifity oximu na konkrétny inhibítor (Kassa, 2011a).

Jednou z ďalších ciest, ktorou sa uberá aj náš experiment je pokračovanie v zatiaľ neúspešnej snahe nasyntetizovať nové širokospektrálne antidotum oximovej povahy.

Ďalší nádejný spôsob, ako odstrániť nevýhody reaktivátorov predstavujú tzv. neiónové oximové reaktivátory, ktoré zvyšujú lipofilitu molekuly a podnecujú tým jej šance k prieniku cez HEB. Po prevedení viacerých výskumov sa ukázalo, že tieto látky sú naozaj schopné HEB prekonať, avšak prílišná lipofilita spôsobuje problém vo vylučovaní týchto látok z organizmu, keďže je tu pozorovateľná nízka rozpustnosť v hydrofilných roztokoch. Zmieňovaná nízka rozpustnosť v hydrofilných tekutinách znemožňuje aj intramuskulárne a intravenózne cesty podania. Absencia náboja znižuje zase reaktivačné schopnosti týchto oximov. Rieši sa to napríklad pridaním funkčných skupín. Doposiaľ sa však podarilo nasyntetizovať len pár naozaj účinných látok preto je otázne, či by sa malo v tomto výskume pokračovať (Gorecki, 2016; De Koning, 2018; Gupta, 2014).

Nové možnosti výskumu podporili využitie nanočastíc s naviazanými oximami. Využitý bol práve oxim HI-6 naviazaný na nanočastice oxidu kremičitého. Nanočastice boli použité na AChE myši v mozgu inhibovaných sarinom, aby mozog ochránili pred možným poškodením (Yang, 2016).

Keďže obavou nie je len neschopnosť vyviazať OP z väzby na AChE ale takisto možnosť opätovného naviazania sa OP na už zreaktívovanú AChE pozorujeme vznik tzv. bioscavengerov, ktorých hlavnou funkciou je zachytiť nezreagované OP už v krvi, aby sa nedostali do CNS ani do periférie. Po vychytení molekúl OP nastáva ich rozklad (Sharma, 2015; Rice, 2016).

Z predchádzajúceho výkladu jasne vyplýva, že ciest, ktorými sa môže výskum reaktivátorov AChE uberať je mnoho, otázkou však zostáva, ktorú z nich si vybrať.

7. Záver

Z názvu diplomovej práce je zrejmé, že jej cieľom bolo otestovať reaktivačnú schopnosť novo syntetizovaného oximu K 870 voči ireverzibilnému inhibítoru tabunu. Tento oxim mal za úlohu z enzýmu AChE vyviazať tabun, aby enzým mohol naďalej spĺňať svoju funkciu. Potenciálne antidotum K 870 patrí medzi bispyridínové K oximy, z čoho vyplýva aj jeho štruktúra, ktorá sa nápadne podobá oximu K 203. Reaktivačné účinky oximu K 203 na AChE inhibovanú tabunom sú veľmi uspokojivé ba dokonca kvôli prítomnosti karbamoylovej štruktúry vykazuje nízku vnútornú toxicitu. Jediným jeho nedostatkom je neschopnosť prestúpiť HEB. Tento problém mal riešiť práve nami testovaný oxim K 870, ktorý sa oproti oximu K 203 líši dvoma atómami chlóru substituovanými na jednom z pyridínových jadier. Táto substitúcia je výsledkom snahy získať natoľko lipofilnú molekulu aby bola schopná ľahko prechádzať cez HEB do mozgu, na miesto s vysokou koncentráciou AChE.

Experiment jednoznačne potvrdil, že oxim K 870 je schopný do určitej miery enzým periférne reaktivovať. Testovacie vzorky preukázali najlepšiu úspešnosť spomínaného oximu v krvi, kde bola pozorovaná najvyššia koncentrácia reaktivovaného enzýmu AChE po porovnaní so vzorkami štandardov (HI-6 dichlorid, pralidoxim metánsulfát). U bránice oxim K 870 manifestoval vyššiu reaktiváciu ako pralidoxim ale reaktivácii oximom HI-6 sa nevyrovnal. Napriek spomínaným chlóróm v molekule oximu K 870 výsledky jasne poukazujú na fakt, že sa tento oxim do mozgu vôbec nedostavil a nedokázal tak AChE v týchto vzorkách reaktivovať. Aktivity AChE vo vzorkách mozgov reaktivovaných štandardmi dosahovali takisto nízke hodnoty.

Oxim K 870 nedosahuje v mozgu vysoký stupeň reaktivácie a jeho schopnosť reaktivácie v ostatných tkáňach (bránica a krv) je porovnateľná s terapeuticky užívanými antidotmi a preto nie je nutné nahrádzať ním komerčne dostupné antidotá. Medzi doposiaľ dostupné spôsoby prekročenia reaktivátorov cez HEB patrí glykozylácia a následný transport cez prenášač pre glukózu (GLUT-1), inhibícia P-glykoproteínu (efluxného transportéru), prenos pomocou nanočastíc... Lepšie by však bolo nájsť reaktivátor, ktorý by prestupoval cez HEB do mozgu a zachoval si svoj reaktivačný potenciál v tkáňach.

8. Zoznam skratiek

AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholinesteráza
Ala	alanín
Asp	aspartát
ATChJ	acetyltiocholínjodid
BCh	butylcholín
BChE	butylcholinesteráza
C _{max}	maximálna koncentrácia
CNS	centrálny nervový systém
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoová kyselina
fALS	familiárna amyloidná laterálna skleroza
Glu	kyselina glutámová
Gly	glycín
HEB	hematoencefalická bariéra
HI-6	asoxim
His	histidín
Ch	cholín
ChAT	cholínacetyltransferáza
ChZ	chemické zbrane
i.m	intramuskulárne podanie

LD ₅₀	Lethal doses 50% stredná smrtná dávka
LueH	obidoxim
MG	Myasthenia gravis
MMG-4	metoxim
NPL	nervové paralytické látky
o.p.	perorálne podanie
OP	organofosfáty
PD	Parkinsonova choroba
Phe	fenyalanín
Ser	serín
t _{max}	čas, za ktorý je dosiahnutá maximálna koncentrácia
Tyr	tyrozín
VRX	označenie pre ruské nervové paralytické látky
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia
2-PAM	pralidoxim metánsulfát

9. Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 Základné informácie o tabune	20
Tabuľka 2 Základné informácie o cyklosaríne.....	20
Tabuľka 3 Základné informácie o saríne	20
Tabuľka 4 Základné informácie o somane.....	21
Tabuľka 5 Základné informácie o látke VX	21
Tabuľka 6 Základné informácie o VRX.....	21
Tabuľka 7 Riedenie kalibračných roztokov cysteínu.....	40
Tabuľka 8 Látky podané jednotlivým skupinám vzoriek krvi	43,47
Tabuľka 9 Látky podané jednotlivým skupinám vzoriek bránič	44,48
Tabuľka 10 Látky podané jednotlivým skupinám vzoriek mozgov.....	45,49

10. Zoznam obrázkov, schém a rovníc

Obrázok 1 Štruktúra ACh.....	12
Obrázok 2 Súhrn dejov spojených s ACh v organizme	12
Obrázok 3 Štruktúra AChE	14
Obrázok 4 Základne štruktúry OP/ fosfátov/ fosfonátov , kde X je odstupujúca skupina a R1, R2 je alkyl alebo aryl	19
Obrázok 5 Najvýznamnejšie mono- a biskvartérne reaktívatory AChE	29
Obrázok 6 Základné štruktúry niektorých K-oximov	30
Obrázok 7 Tabun.....	38
Obrázok 8 2-PAM (pralidoxim).....	38
Obrázok 9 HI-6 (asoxim)	38
Obrázok 10 Štruktúra oximu K 870	39,46
Schéma 1 Proces hydrolýzy ACh pomocou AChE.....	15
Schéma 2 Proces inhibície AChE.....	22
Schéma 3 Proces reaktívácie AChE	31
Schéma 4 Rozštiepenie acetyltiocholínu AChE na kyselinu octovú a tiocholín.....	41
Schéma 5 Štiepene S-S mostíkov a väzba tiocholínu na DTNB.....	42
Schéma 6 Konjugácia dvojitych väzieb kyseliny 2-merkpto-2-nitrobenzoové.....	42
Rovnica 1 Percento reaktívácie AChE inhibovanej tabunom	46

11. Zoznam grafov

Graf 1 Hodnoty aktivít AChE jednotlivých skupín vzoriek krvi	47
Graf 2 Hodnoty aktivít AChE jednotlivých skupín vzoriek bránic.....	48
Graf 3 Hodnoty aktivít AChE jednotlivých skupín vzoriek mozgov.....	49

12. Zoznam použitej literatúry

- BAJGAR J., FUSEK J. a HRDINA V. (1991). *Vojenská toxikologie*. Hradec Králové: Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně: Grada. ISBN 97880-85109-36-8.
- BAJGAR J. (1985). *Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie*. KIML J. *Prevence nemocí ušních, nosních a krčních, poruch sluchu, hlasu a řeči*. Praha: Avicenum. s. 18-23
- BAJGAR J. (2004). Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Advances in clinical chemistry.*, Vol. 38: 151-216. Dostupné z doi: 10.1016/S0065-2423(04)38006-6
- BAJGAR J. a FUSEK J. (2006). *Používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu: od historie k současnosti*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2006. ISBN 978-80-86225-75-3.
- BAJGAR J. et al. (2007). Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, s. 7(5): 461–466. Dostupné z doi: 10.2174/138955707780619581
- BALALI-MOOD M. a SABER H. (6. 2012). Recent advances in the treatment of organophosphorous poisonings. *Iranian Journal of Medical Sciences*, s. 32(2): 74-91. ISSN 0253-0716.
- BARTOSOVA L., KUCA K., KUNESOVA G., JUN D. (9. 6. 2006). The acute toxicity of acetylcholinesterase reactivators in mice in relation to their structure. *Neurotox Research*, s. (4):291-296. Dostupné z doi:10.1007/BF03033319
- BRENNER T., NIZRI E., IRONY-TUR-SINAI M., HAMRA-AMITAY Y., WIRGUIN I.(15. 7. 2008). Acetylcholinesterase inhibitors and cholinergic modulation in Myasthenia Gravis and neuroinflammation. *Journal of Neuroimmunology*, s. 121-127. Dostupné z doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.05.022
- CABAL J., BAJGAR J. (19. 3. 1999). Tabun- návrat po padesáti letech. *Chem. Listy*, Vol. 93: s. 27-31.
- DE JONG et al. (15. 2. 1989). The bispyridinium-dioxime HLö-7: A potent reactivator for acetylcholinesterase inhibited by the stereoisomers of tabun and soman. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 38(4) s. 633–640. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(89)90209-8
- DE KONING, CONSTANTIJN M., HORN G., WOREK F. a VAN GROEL M.(2018) Discovery of a potent non-oxime reactivator of nerve agent inhibited human acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry* 157, 151–160 ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2018.08.016
- DOLEŽAL M. (2016). *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém. 2. vydání*. Praha: Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3460-9.

- EDDLESTON M., SZINICZ L., EYER P. a BUCKLEY N. (5. 2002). Oximes in acute organophosphate pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*, Vol. 95(5) s. 275-283. ISSN 1460-2725.
- ENSERINK M. (2013). Chemical weapons. U.N. taps special labs to investigate Syrian attack. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6150):1050–1051. Dostupné z doi:10.1126/science.341.6150.1050
- GANESAN K., RAZA S. K., VIJAYARAGHAVAN R. (2010). Chemical warfare agents. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, s. 166-178. Dostupné z doi:10.4103/0975-7406.68498
- GIACOBINI E. (10. 2004). Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research*. s. 433-440. Dostupné z doi: 10.1016/j.phrs.2003.11.017
- GORECKI L. et al. (12. 2016). SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Archives of Toxicology*, 90(12), 2831–2859. ISSN 1432-0738. Dostupné z doi:10.1007/s00204-016-1827-3
- GORECKI L. et al. (2016) Progress in acetylcholinesterase reactivators and in the treatment of organophosphorus intoxication: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* 27(9), 971–985. Dostupné z doi:10.1080/13543776.2017.1338275
- GREENE S. A., POHANISH R. P. (2005). *Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals*. New York: William Andrew Publishing. ISBN: 978-14-557-3148-0
- GUPTA B. et al.(2014) In vitro reactivation kinetics of paraoxon- and DFPinhibited electric eel AChE using mono- and bis-pyridinium oximes. *Archives of Toxicology* 88(2), 381–390 ISSN 1432-0738. Dostupné z doi:10.1007/s00204-013-1136-z
- HOLMES C., BALLARD C., LEHMANN D., SMITH A., BEAUMONT H., DAY I., KHAN M., LOVESTONE S., McCULLEN M., MORRIS C., MUNOZ D. et al. (2005) Rate of progression of cognitive decline in Alzheimer's disease effect of butyrylcholinesterase K gene variation. *J. Neurol., Neurosurg. Psychiatry*. 76, 640–3.
- CHAI P. R., BRYAN D., ERICKSON T. B. a BOYER E. W. (2018). Novichok agents: a historical, current, and toxicological perspective. *Toxicology Communications*., 2(1): 45–48. Dostupné z doi:10.1080/24734306.2018.1475151
- JOKANOVIĆ M. (2009). Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicology letters*, s.107-115. Dostupné z doi: 10.1016/j.toxlet.2009.07.025
- KARASOVÁ J. et al. . (2009). Je fluorace oximů tou správnou cestou ke zvýšení průniku těchto látek do centrálního nervového systému? *Vojenské Zdravotnické Listy 1* , s. 23-27.
- KARASOVÁ J. Ž. (2010). *Stanovení reaktivátorů acetylcholinesterasy a organofosfátů v tkáních - prechod cez bariéry. Dizertačná práca.* (Zv. pp.21-24, 39-44, 49). Hradec Králové: Fakulta vojenského zdravotnictví. Univerzita obrany v Brně.
- KARLSON P. (1981). *Základy biochemie. 3. přepracované vydání.* Praha: Academia. ISBN:104-21-852

- KASSA et al. (8. 7. 2011). 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*, s. 9: s.225-230. KASSA J, S. V. (7. 2014). A comparison of the reactivating and therapeutic efficacy of two novel oximes K378 and K458 with currently available oximes in rats and mice poisoned with sarin. *Journal of Applied Biomedicine*, s. 155-160. ISSN 1214021X. Dostupné z doi:10.2478/v10136-011-0011-6.
- KASSA J., MISIK J., HATLAPATKOVA J. a Zdarova KARASOVA J.(27. 3 2017). 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*, s. 236-243. doi:doi:10.1080/15376516.2016.1275907
- KASSA J, HEPNAROVÁ V., MUSILEK K. a JUN D. (2. 9. 2018). A comparison of the reactivating and therapeutic efficacy of a novel bispyridinium oxime K 870 with commonly used pralidoxime and the oxime HI-6 in sarin-poisoned rats and mice. *Military Medical Science Letter*, s. 105. ISSN 2571-113X
- KASSA J. (3. 2011 b). A Comparison of Reactivating and Therapeutic Efficacy of Bispyridinium Acetylcholinesterase Reactivator KR-22934 With the Oxime K203 and Commonly Used Oximes (Obidoxime, Trimedoxime, HI-6) in Tabun-Poisoned Rats and Mice. *Toxicology mechanisms and methods*, s. 21(3):241-5 Dostupné z doi:10.3109/15376516.2010.538750
- KASSA J., JUN D., KUČA K. (2007) A comparison of reactivating efficacy of newly developed oximes (K074, K075) and currently available oximes (obidoxime, HI-6) in cyclosarin and tabun-poisoned rats. *Journal of Enzym. Inhib. Med. Chem.* 22(3), s.296- 300.
- KASSA J., KARASOVA J., MUSILEK K. a KUČA K. (20. 1. 2008). 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*, s. 311-316. ISSN 0300-483X. Dostupné z doi:10.1016/j.tox.2007.10.015
- KASSA J. K. (1. 14. 2011 a). The Benefit of Combinations of Oximes for the Reactivating and Therapeutic Efficacy of Antidotal Treatment of Sarin Poisoning in Rats and Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, s. 109: 30–34. Dostupné z doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00678
- KASSA J. (2002). Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, s. 40.6: 803-816. ISSN 0731-3810. Dostupné z doi:10.1081/clt-120015840
- KALLOW W., GENEST K. (1957) A method for the detection of human serum cholinesterase: determination of dibucaine numbers. *Can. J. Biochem. Physiol.* 35 (6), 339– 46
- KLEMENT C. (2011). *Mimoriadne udalosti vo verejnom zdravotníctve. 1. vyd.* Banská Bystrica: PRO. ISBN 978-80-89057-29-0.

- KLOSKE M. a WITKIEWICZ Z. (2019). Novichoks – The A group of organophosphorus chemical warfare agents. *Chemosphere*, s. 221, 672–682. ISSN 00456535. Dostupné z doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.054
- KOVARIK M., KUCA K., JUN D., JELIĆ D., RADIĆ B., VRDOLJAK AL., CALIĆ M. (2006). In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: Mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. *Toxicology*, s. 85-96. Dostupné z doi: 10.1016/j.tox.2005.11.003
- KOVARIK Z., RADIĆ Z., HARVEY A. B., SIMEON-RUDOLF V., REINER E., PALMER T. (2003). Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochemical journal*, 33-40. Dostupné z doi: 10.1042/BJ20021862
- KUCA K. et al. (11. 7. 2015). Universality of oxime K203 for reactivation of nerve agent-inhibited AChE. *Medicinal Chemistry (Shariqah (United Arab Emirates))*, s. 683-686. ISSN 1875-6638. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/130155/article>
- KUCA K., JUN D., MUSILEK K. (2006) Vliv délky a tvaru spojovacího řetězce biskvartérních reaktivátorů acetylcholinesterasy na jejich schopnost reaktivovat enzym inhibovaný sarinem. *Voj. zdrav. Listy*. Vol. 1, s. 37-40
- LEDVINA A. (2009). *Biochemie nervových funkcí. In Biochemie pro studující medicíny II. díl.* Praha: Karolinum.
- LI B., DUYSSEN E., CARLSON M., LOCKRIDGE O. (2008) The butyrylcholinesterase knockout mouse as a model for human butyrylcholinesterase deficiency. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 324, 1146–54
- LOCKRIDGE O., BARTELS C., VAUGHAN T., WONG C., NORTON S., JOHNSON L. (1987) Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 549–557.
- LORKE D. E. a PETROIANU G. A. (2019). Reversible cholinesterase inhibitors as pretreatment for exposure to organophosphates. A review. *Journal of Applied Toxicology*, 39(1): 101–116. . ISSN 10991263. Dostupné z doi:10.1002/jat.3662
- MACKUROVÁ M. (2018). *Hodnocení účinnosti kvartérních reaktivátorů acetylcholinesterasy in vivo. Diplomová práce.* Hradec Králové.
- MALINAK, David, et al. (2018) Novel group of AChE reactivators—synthesis, in vitro reactivation and molecular docking study. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 23(9) ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23092291
- MANOHARAN I., BOOPATHY R., DARVESH S., LOCKRIDGE O., (2007) A medial health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in Vysya community of India. *Clin. Chim. Acta* 378, 128–135
- MARRS et al. (2007). *Chemical warfare agents: toxicology and treatment.* Wiley: Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ : Wiley,. ISBN:9780470013595 Dostupné z doi: 10.1002/9780470060032
- MARTÍNKOVÁ J. et al. (2007). *Farmakologie pro studenty zdravotnických odborů.* Praha: Grada Publishing. ISBN: 978-80-247-1356-

- MERCEY G et al. (23. 2 2012). Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Accounts of Chemical Research* , s. 756-766. ISSN 0001-4842. Dostupné z doi:10.1021/ar2002864
- MIKA, O. J. a ŘÍHA M. (2011). *Ochrana obyvatelstva před následky použití zbraní hromadného ničení. . Vyd. 1.* Praha: Námořní akademie České republiky. ISBN: 978- 80-87103-31-9
- MUSILEK K. et al. (2007) Novel series of bispyridinium compounds bearing a (Z) but-2- ene linker – synthesis and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 17:s.3172-74.
- MUSLEK K. et al. (2011). Progress in Antidotes (Acetylcholinesterase Reactivators) Against Organophosphorus Pesticides. *Pesticides in the Modern World - Effects of Pesticides Exposure* , 341-358. Dostupné z doi:10.5772/17287
- NEPOVIMOVA E. a KUČA K. (2018). Chemical warfare agent NOVICHOK - mini-review of available data. *Food and Chemical Toxicology*, s. 343–350. ISSN 02786915. Dostupné z doi:10.1016/j.fct.2018.09.015
- PATOČKA et al. (2004). *Vojenská toxikologie*. Praga: Grada. ISBN 978-80-2470608-5.
- PETROIANU G. A. (2013) The history of pyridinium oximes as nerve gas antidotes: the British contribution. *Die Pharmazie*.68(11), 916–918. ISSN 0031-7144.
- PETROIANU G A. (2012) The history of cholinesterase reactivation: hydroxylamine and pyridinium aldoximes. *Die Pharmazie*. 67(10), 874–879. ISSN 0031- 7144.
- PINTO, T. a LANCTOT K. (9. 2011). Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type. *Ageing Research Reviews*, s. 404-412. Dostupné z doi: 10.1016/j.arr.2011.01.003.
- PITSCHMANN V. (6. 20014). Overall View of Chemical and Biochemical Weapons. *Toxins*, s. 1761–1784 . Dostupé z doi:10.3390/toxins6061761
- PITSCHMANN V. (2003). *Detekční trubičky: analýza vojensky významných toxických látek*. Beroun: Econt Consulting. ISBN: 978-80-86664-01-9.
- PLETCHER K. (4.. 3. 2010). *Tokyo subway attack of 1995*. Dostupné na Internetu: Britanica: <https://www.britannica.com/event/Tokyo-subway-attack-of-1995>
- PRYMULA R. et al. (2002). *Biologický a chemický terorismus: informace pro každého.1.vyd.* Praha: Grada. ISBN 978-80-247-0288-9.
- PSOTKA M. et al. (6. 2017). HLö-7 - A review of acetylcholinesterase reactivator against organophosphorous intoxication. *MMSL*, s. 86(2):70–83. ISSN 03727025. Dostupné z doi:10.31482/mmsl.2017.011
- RICE H. et al. (2016) The potential role of bioscavenger in the medical management of nerve-agent poisoned casualties. *Chemico-Biological Interactions* 259, 12th International Meeting on Cholinesterases and 6th Conference of Paraoxonase, 175–181 ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2016.04.038
- ROSMAN Y. et al. (2014). Lessons learned from the Syrian sarin attack: evaluation of a clinical syndrome through social media. *Annals of Internal Medicine*. ISSN 1539-3704. Dostupné z doi:10.7326/M13-2799

- SAXENA A., SUN W., LOU C., MYERS T., KOPLVITZ I., LENZ D., DOCTOR B. (2006) Bioscavenger for protection from toxicity of organophosphorus compounds. *J. Mol. Neurosci.* 30, 145–148.
- SHARMA R. et al. (2015) Development and structural modifications of cholinesterase reactivators against chemical warfare agents in last decade: a review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 15(1), 58–72. ISSN 1875-5607. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/126444/article>
- SIDELL F.R., GROFF W. A. (8. 1. 1971). Intramuscular and intravenous administration of small doses of 2-pyridinium aldoxime methochloride to man. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(8):1224-1228. Dostupné z doi:10.1002/jps.2600600823
- SINGH M. K., KAUR M., KUKREJA H. (12. 2013). Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *European Journal of Medicinal Chemistry*, s. (70)165-188. Dostupné z doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.050
- SUSSMAN J. L et al. (8. 1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, s. 872-879. Dostupné z doi:10.1126/science.1678899
- ŠEPSOVÁ V, ZDAROVA KARASOVA J., KORABECNY J., DOLEZAL R., ZEMEK F., BENNION B. J., KUCA K. (8. 2013). Oximes: Inhibitors of Human Recombinant Acetylcholinesterase. A Structure-Activity Relationship (SAR) Study. *International Journal of Molecular Science*, s. 14(8): 16882-16900. Dostupné z doi: 10.3390/ijms140816882
- TATTERSALL, J. (6. 2018). Anticholinesterase toxicity. *Current Opinion in Physiology*, s. Neuromuscular Junctions, 49–56. Dostupné z doi:10.1016/j.cophys.2018.05.005
- WOREK F. et al. (1996) Reactivation by variol oxime of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus compounds, *Arch. Toxicol.* 70:s.497-503.
- WOREK F. a THIERMANN H. (2013). The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacology & Therapeutics*, s. 139(2), 249–259. Dostupné z doi:10.1016/j.pharmthera.2013.04.009
- YANG J. et al. (2016) Rapid-releasing of HI-6 via brain-targeted mesoporous silica nanoparticles for nerve agent detoxification. *Nanoscale*. 8(18), 9537–9547 ISSN 2040-3372. Dostupné z: doi:10.1039/C5NR06658A
- YEN T., NIGHHTINGALE B., BURNS J., SULLIVAN D., STEWARD P. (2003) Butyrylcholinesterase (BCHE) genotyping for post-succinylcholine apnea in an Australian population. *Clin. Chem. (Washington, D.C.)* 9, 1297–1308.
- ZORBAZ, T. MALINAK D., KUCA K., MUSILEK K., KOVARIK Z (18. 4. 2019). Butyrylcholinesterase inhibited by nerve agents is efficiently reactivated with chlorinated pyridinium oximes. *Chemico-Biological Interaction*, s. 1- 11. Dostupné z doi: 10.1016/j.cbi.2019.04.020
- ZORBAZ T., MARAKOVIĆ N., MUSILEK K., KOVARIK Z (2018) Chlorinated pyridinium oxime sare potent reactivators of acetylcholinesterase inhibited by nerve agents. *Military Medical Science Letters* s.94 ISSN 2571-113X

Autonomic Nervous System Synapse (online 10. 4. 2020) dostupné z:
<https://www.slideshare.net/ravengj/autonomic-nervous-system-synapse>