

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**ORGÁNOVÉ ZMĚNY PO PERKUTÁNNÍ EXPOZICI
SIRNÉMU YPERITU**

Diplomová práce

ve spolupráci s

UNIVERZITOU OBRANY V BRNĚ

FAKULTOU VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedrou toxikologie

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Externí školitel: pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D. et Ph.D.

Hradec Králové 2020

Veronika Šulová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 10. 09. 2020

.....

podpis studentky

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala svému vedoucímu doc. PharmDr. Lukáši Červenému, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce, vstřícnost, pomoc a trpělivost při řešení problémů.

Mé poděkování patří též externímu školiteli pplk. doc. MUDr. Jaroslavu Pejchalovi, Ph.D. et Ph.D., za cenné rady, poznámky a připomínky, které mi poskytoval nejen v průběhu experimentální části práce, ale také při jejím sepisování, a za ochotu odpovídat na všechny moje dotazy. Rovněž bych chtěla poděkovat paní laborantce Šárce Průchové za pomoc při zpracování histologických preparátů.

Dále děkuji pplk. prof. RNDr. Miroslavu Pohankovi, Ph.D., DSc., a paní laborantce Bc. Jitce Žákové za umožnění provedení části mé experimentální práce v jejich laboratoři, za jejich pomoc, ochotu a vytváření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji svojí rodině a příteli, kteří mě během psaní diplomové práce podporovali.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Veronika Šulová

Školitel: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Externí školitel: pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D. et Ph.D.

Název diplomové práce: Orgánové změny po perkutánní expozici sirnému yperitu

Sirný yperit je bojová chemická látka spadající do skupiny zpuchýřujících otravných látek. Značná část teorie je zaměřena především na popis akutních toxických účinků a mechanismu působení a zabývá se také současnými možnostmi terapie otrav.

Experimentální část je zaměřena na sledování vlivu perkutánní otravy sirným yperitem na tkáň jater, plic a ledvin u myších samic kmene C57BL/6J. Hlavním cílem této práce bylo zhodnocení markerů oxidačního stresu a vyhodnocení vzniklých histopatologických změn ve vybraných vnitřních orgánech v intervalu tří, pěti a sedmi dnů. Ke stanovení markerů oxidačního stresu byly použity metody FRAP (ferric reducing antioxidant power) a TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). Histopatologické změny byly vyhodnoceny mikroskopicky za použití metody barvení hematoxylin-eozinem. U plic byla hodnocena i vzdušnost plicního parenchymu pomocí počítačové analýzy obrazu. Nejdříve došlo k experimentálnímu stanovení LD₅₀ (109,2 mg/kg). Poté byly v odebraných orgánech hodnoceny změny po podání 25 %, 50 %, 75 %, 100 % a 150 % LD₅₀. Hodnoty TBARS vykazovaly ve všech sledovaných orgánech pokles, který byl závislý na konkrétní dávce a čase. Hladiny FRAP byly naopak ve většině případů zvýšené, což indikuje rozvinutou kompenzační antioxidační reakci organismu. V závislosti na dávce yperitu a čase po expozici byly pozorovány i změny v histopatologickém obraze. Plicní tkáň se jevila jako nejvíce senzitivní, zatímco ledviny nejvíce rezistentní vůči účinkům yperitu. Výsledky diplomové práce prokázaly, že yperit vyvolává dávkově a časově závislé změny parametrů oxidačního stresu a histopatologického obrazu v jaterní, plicní a ledvinné tkáni po perkutánní intoxikaci. Myši kmene C57Bl/6J se jeví jako model vhodný pro další experimentální výzkum.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Veronika Šulová

Supervisor: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

External supervisor: pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D. et Ph.D.

Title of diploma thesis: Changes of internal organs after percutaneous exposure to sulfur mustard

Sulfur mustard is a chemical warfare agent belonging to the group of blistering agents. The theoretical section of the thesis is mainly focused on the description of acute toxic effects, the mechanism of action, and deals with the current possibilities of poisoning therapy. The experimental section is focused on monitoring the effect of sulfur mustard poisoning in the liver, lung, and kidney of female C57BL/6J mice after the percutaneous administration. This work aimed to evaluate markers of oxidative stress and histopathological changes of the selected organs at 3, 5, and 7 days after the poisoning. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) methods were used to determine markers of oxidative stress. Histopathological changes were evaluated microscopically using the hematoxylin-eosin staining method. The airness of the lung parenchyma was also assessed by computer image analysis. First, the LD₅₀ of sulfur mustard was experimentally determined (109.2 mg/kg). Organ changes were then assessed after administration of 25%, 50%, 75%, 100%, and 150% LD₅₀. TBARS values showed a decrease in all monitored organs depending on the specific dose and time. Contrarywise, FRAP levels increased in most cases, which indicates a developed compensatory response of the organism. Depending on the dose of mustard and time after exposure, we observed changes in the histopathological picture. The lung tissue appeared to be the most sensitive, while the kidneys seemed the most resistant to the mustard gas effects. The results of the diploma thesis show that mustard induces dose- and time-dependent changes in the parameters of oxidative stress and histopathological picture in the liver, lung and kidney tissue of mice after percutaneous intoxication. C57BL/6J mice appear to be a suitable model for further experimental research.

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK	10
2	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	12
3	TEORETICKÁ ČÁST	14
3.1	Zařazení sirného yperitu mezi zbraně hromadného ničení	14
3.2	Toxicita a cesty vstupu yperitu do organismu	15
3.3	Historie použití yperitu	15
3.4	Syntéza.....	16
3.5	Fyzikální vlastnosti	17
3.6	Chemické vlastnosti	19
3.7	Mechanismus účinku	21
3.7.1	Poškození DNA	21
3.7.2	Reparace genetického poškození indukovaného yperitem	23
3.7.3	Možnosti reparace poškozené DNA	24
3.7.3.1	Oprava DNA monoaduktů	24
3.7.3.2	Oprava zesítěné DNA	25
3.7.3.3	Oprava dvojitých zlomů DNA	26
3.7.4	Oxidační stres	28
3.7.5	Buněčná smrt	30
3.7.5.1	Apoptóza	31
3.7.5.2	Nekróza	32
3.8	Klinický obraz při akutní intoxikaci	32
3.8.1	Oči.....	32
3.8.2	Kůže	34
3.8.3	Respirační systém	35
3.8.4	Systémová toxicita	36
3.9	První pomoc a terapie	37
3.9.1	Zásady první pomoci	37
3.9.2	Antidotální léčba	38
3.9.3	Dekontaminace a terapie	38
3.9.3.1	Gastrointestinální trakt.....	38
3.9.3.2	Kožní léze	38
3.9.3.3	Oční léze	39
3.9.3.4	Respirační systém	40

3.9.4	Antioxidační léčba	40
4	HYPOTÉZA	41
5	CÍLE PRÁCE.....	42
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
6.1	Materiál a metodika	43
6.1.1	Chemikálie	43
6.1.2	Pomůcky a přístroje	44
6.1.3	Pokusná zvířata	45
6.1.4	Experimentální modely.....	45
6.1.4.1	Experimentální model 1	45
6.1.4.2	Experimentální model 2.....	46
6.1.5	Homogenizace orgánů pro stanovení oxidačního stresu.....	47
6.1.6	Ferric reducing antioxidant power (FRAP)	47
6.1.7	Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)	48
6.1.8	Zhotovení histologických preparátů	49
6.2	Vyhodnocení preparátů.....	52
6.3	Prezentace dat a statistická analýza	52
7	VÝSLEDKY	54
7.1	Experimentální model 1	54
7.1.1	Přežívání zvířat	54
7.1.2	Stanovení LD ₅₀	54
7.2	Experimentální model 2.....	55
7.2.1	Přežívání zvířat	55
	Vliv LD ₅₀ na změny hmotnosti.....	55
7.2.2	Stanovení TBARS.....	56
7.2.3	Stanovení FRAP	58
7.2.4	Histopatologické vyšetření jater	60
7.2.5	Histopatologické vyšetření plic	64
7.2.6	Histopatologické vyšetření ledvin	67
8	DISKUZE	70
9	ZÁVĚR	75
10	LITERATURA	76
11	PŘÍLOHY	

1 SEZNAM ZKRATEK

APaf-1	apoptotickou proteázu aktivující faktor 1
ATM	proteinová kináza mutovaná u onemocnění ataxia telangiectasia
ATP	adenosintrifosfát
ATR	proteinová kináza příbuzná proteinům ATM a Rad3
BER	bázová excizní reparace
BCHL	bojové chemické látky
CEES	2-chlorethylethylsulfid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA-dependentní proteinová kináza
DSBs	dvojité zlomy
FeCl₃	chlorid železitý bezvodý
FRAP	z angl. ferric reducing antioxidant power (ukazatel kapacity antioxidačních systémů)
FVZ UO	Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany
GSH	glutathion
HCl	chlorovodíková kyselina
HR	homologní rekombinace
IGF-1	insulinu podobný faktor-1
IQR	mezikvartilový rozptyl
JNK	c-Jun-N-terminální kináza
LC₅₀	střední letální koncentrace
LD₅₀	střední letální dávka
MDA	malonyldialdehyd
MRN komplex	MRE11-Rad50-NBS1
NAD⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NER	nukleotidová excizní reparace
NHEJ	nehomologní spojování konců
NO	oxid dusnatý
OL	otravné látky
OPCW	organizace pro zákaz chemických zbraní

p53	protein o molekulové hmotnosti 53 kD
PARP	poly(ADP-ribóza)polymeráza
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutáza
SSA	z angl. single-strand annealing (jednovláknové žíhání)
STH	somatotropin
TBA	thiobarbiturová kyselina
TBARS	z angl. thiobarbituric acid reactive substances (ukazatel míry peroxidace lipidů)
TCA	trichloroctová kyselina
TNFα	tumor nekrotizující faktor α
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazin
UV	ultrafialové
Yperit	sirný yperit

2 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Sirný yperit (yperit), z anglického sulphur (sulfur) mustard nebo mustard gas, patří mezi zpuchýřující otravné látky (OL) a je zároveň nejdůležitějším zástupcem této skupiny OL (Patočka et al. 2004). V praxi se též můžeme setkat se zjednodušeným názvem yperit nebo s názvy jako hořčičný plyn či destilovaný yperit (Ghabili et al. 2011, Patočka et al. 2004, Pitschmann 2005). Za první světové války se dělostřelecké granáty obsahující yperit značily žlutým křížem (Balali-Mood a Hefazi 2005). V této válce zaznamenaly bojové chemické látky (BCHL) nejrozsáhlejší využití, přičemž právě zpuchýřující OL vykazovaly nejpustošivější dopady. Dle odhadů bylo v první světové válce celkově použito 11 tisíc tun zpuchýřujících BCHL, které zasáhly bezmála půl miliónu lidí. Za 77 % obětí je zodpovědný yperit. Kromě toho způsobil spoustu těžkých zranění s trvalými následky, což rychle vedlo k rozvoji ochranných prostředků (Jošt et al. 2018, Pitschmann 2005).

V současnosti jsou vývoj, produkce, skladování nebo uchování yperitu (a dalších BCHL) dle Úmluvy o chemických zbraních striktně zakázány. Dodržování této konvence zaštiťuje Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW) (OPCW 2020). Na druhou stranu je ale pravděpodobnost použití yperitu stále poměrně vysoká, a to z několika důvodů (Patočka et al. 2004).

Prvním z nich je jednoduchá syntéza yperitu. Toho mohou využít jak světové velmoci, tak méně vyspělé státy, teroristické organizace nebo extrémistické skupiny (Jílková 2008). K teroristickému zneužití zpuchýřujících OL došlo například v Sýrii v roce 2016. Ačkoliv byly dle OPCW všechny BCHL ze Sýrie v lednu 2016 odstraněny, v tomto měsíci byly použity zpuchýřující látky ze strany islámského státu proti kurdským vojákům. S nejvyšší pravděpodobností se jednalo právě o yperit (Annen 2018, Johnston 2017, Scott 2017).

Dalším problémem je výše zmíněná existence velkého množství skladových zásob. Tyto zásoby vznikly během světových válek a následné studené války a jsou podle Úmluvy určené ke zničení (Fitzgerald 2008, Patočka et al. 2004). Jedná se však o pomalý proces. Pro představu lze zmínit sklad v americkém městě Pueblo. Zde se nachází největší skladiště BCHL, ve kterém bylo v roce 2016 uloženo více než 780 000 projektilů, minometných granátů a lahví naplněných yperitem. V témže roce byl zprovozněn závod na likvidaci těchto zásob, přičemž do roku 2019 bylo naplánováno

zničit pouze asi $\frac{1}{4}$ (2600 tun) yperitu. Tato skutečnost poukazuje na to, jak je proces likvidace náročný (Colorado Public Radio Staff a The Associated Press 2019).

Vysoké riziko úniku BCHL (včetně yperitu) do životního prostředí představují i jejich „zásoby“ nacházející se v pomalu rezavějících bednách, sudech a municích na dně moří a oceánů nebo v půdě. Tyto zdroje jsou odhadovány na tisíce tun a jedná se o pozůstatky z první a druhé světové války. V roce 2018 bylo například nalezeno 150 kanystrů yperitu zakopaných v zemi v blízkosti Woodhall Spa v Anglii. Rozsáhlejší skládky leží ale v mořích. Nejrozlehlejší z nich se nalézá v Baltském moři, kde se v roce 1997 polským rybářům podařilo vylovit šrapnel s yperitem. Ve Středozemním moři poblíž italského přístavu Bari došlo od 50. let 20. století ke 230 případům úniku yperitu. Za posledních 15 let byly zaznamenány tři úniky yperitu i na východním pobřeží USA. Tragičtější dopad však může mít mechanické poškození munice s yperitem během stavebních prací a její následný výbuch. Takové riziko v současné době představuje budování plynovodu Nord Stream 2, jenž vede Baltským mořem. Pokud by k této situaci došlo, mělo by to obrovské strategické dopady na energetickou síť celé EU (BBC 2018, Kospertová 2017, Overbeek 2011).

S možností zneužití nebo úniku yperitu je ale také spojeno riziko vzniku zdravotnických ztrát. Vzhledem k omezeným klinickým možnostem antidotní a následné terapie zůstává zkoumání mechanismu účinku a rozvoje poškození způsobeného yperitem významnou součástí vojenského výzkumu. Tyto znalosti mohou významným způsobem přispět ke zlepšování možností léčby.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Zařazení sirného yperitu mezi zbraně hromadného ničení

Yperity jsou poměrně heterogenní skupinou, do které kromě yperitu řadíme i oxolový yperit, seskviyperit a dusíkaté yperity (Patočka et al. 2004). Jedná se o chemické zbraně hromadného ničení spadající do skupiny zpuchýřujících OL. Ve skupině zpuchýřujících látek můžeme kromě yperitů najít i fosgenoxim, který v současnosti není vojensky významný, a látky obsahující arsen. Mezi ně patří lewisit, lewisit-yperitová směs, fenylarsindichlorid, ethylarsindichlorid a methylarsindichlorid (Bajgar et al. 1991, Prymula et al. 2002).

Zatímco yperit našel uplatnění jako bojový plyn a v minulosti se používal též k léčbě psoriázy, dusíkatý yperit s označením HN2 je velmi omezeně používán pro terapii Hodgkinovy choroby a lymfomů pod názvem Mustargen (LiverTox 2019, Marrs et al. 2007, Panahi et al. 2015). Alternativní názvy, zkratky a vzorce yperitů jsou uvedeny

v tab. 1.

Tab. 1 Triviální názvy, zkratky, chemické názvy a vzorce yperitů

Triviální název	Zkratka	Chemický název	Vzorec
Yperit	HD	bis-(2-chlorethyl)sulfid	Cl-CH ₂ CH ₂ -S-CH ₂ CH ₂ -Cl
Oxolový yperit	T	bis-(2-chlorethylmerkptoethyl)ether	Cl-CH ₂ CH ₂ -S-CH ₂ CH ₂ -O- -CH ₂ CH ₂ -S-CH ₂ CH ₂ -Cl
Seskviyperit	Q	1,2-bis-(2-chlorethylmerkpto)ethan	Cl-CH ₂ CH ₂ -S-CH ₂ CH ₂ -S- -CH ₂ CH ₂ -Cl
Dusíkaté yperity	HN1	bis-(2-chlorethyl)ethylamin	CH ₃ -CH ₂ -N-(CH ₂ CH ₂ -Cl) ₂
	HN2	bis-(2-chlorethyl)methylamin	CH ₃ -N-(CH ₂ CH ₂ -Cl) ₂
	HN3	tris-(2-chlorethyl)amin	N-(CH ₂ CH ₂ -Cl) ₃

Modifikováno dle: Ghabiliho et al. (2011) a Patočky et al. (2004).

3.2 Toxicita a cesty vstupu yperitu do organismu

Toxicita yperitu je závislá na místě, kudy vstupuje do živého organismu. Nejčastěji proniká kůží, a to v kapalném či plynném stavu, nebo může být jako plyn vdechnut (Kassa et al. 1992). Účinky yperitu nejsou však pouze místní, tedy v oblasti vstupu, ale mohou být i systémové, například ve formě dřeňových, zažívacích nebo neurologických poruch (Bajgar et al. 1991, Balali-Mood a Hefazi 2005, Panahi et al. 2018).

V závislosti na skupenství yperitu mohou být jeho toxické účinky popsány několika konstantami. První z nich, střední letální koncentrace (LC_{50}), se používá, pokud má yperit podobu páry či aerosolu. Nachází-li se yperit v kapalném skupenství, používáme střední letální dávku (LD_{50}). V obou případech se jedná se o koncentraci, respektive dávku, která je u 50 % exponovaných po určité době zodpovědná za smrt (Kassa et al. 1992). V případě inhalačního podání u člověka se hodnota LC_{50} pohybuje v rozmezí 1000 až 1500 $mg \cdot min^{-1} \cdot m^{-3}$. Pokud dojde k percutánní otravě, LC_{50} je 10 000 $mg \cdot min^{-1} \cdot m^{-1}$. LD_{50} je při vstřebání lidskou kůží okolo 100 $mg \cdot kg^{-1}$, ale k tvorbě puchýřů dochází již při dávce 0,03-1,0 $mg \cdot kg^{-1}$. Pokud se člověk otráví perorální cestou, hodnota LD_{50} je zhruba 10 $mg \cdot kg^{-1}$ (Jošt et al. 2018, Patočka et al. 2004).

3.3 Historie použití yperitu

Yperit byl poprvé použit německými vojsky během první světové války. Konkrétně v noci z 12. na 13. července 1917 německými vojsky u belgického města Ypry, nedaleko hranic s Francií (Jošt et al. 2018, Pitschmann 2012). Němci v průběhu 10 dní vypálili na spojenecká vojska Velké Británie a Kanady více než jeden milión dělostřeleckých granátů (Balali-Mood a Hefazi 2005, Jiang a Maibach 2018). Útok si vyžádal kolem 5000 lidských životů (Briggs 2008). Dle místa prvního použití pojmenovali Francouzi tuto OL jako „yperit“ (Pitschmann 1999). Předtím nesl yperit název „Lost“. Toto označení vychází z dvou začátečních písmen příjmení německých chemiků W. Lommela a W. Steinkopfa (Pitschmann 2012). Yperit se tak stal nejpoužívanější a nejefektivnější chemickou zbraní použitou během 1. světové války a svojí efektivitou si vysloužil přezdívku „král bojových plynů“ (Balali-Mood a Hefazi 2005). Mimo jiné byl považován za symbol chemické války (Pitschmann 2012).

Do konce 1. světové války byl zodpovědný za 1 milión zraněných a 100 000 mrtvých vojáků a civilistů (Briggs 2008).

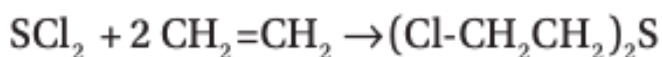
Od konce 1. světové války byl yperit použit v mnoha dalších konfliktech. Užilo jej například Spojené království proti Rudé armádě (1919), španělská vojska proti rífským revolucionářům v Maroku (1921–1927), Italové proti etiopským vojskům (1935–1940) nebo Sovětský svaz proti Japonsku v Xinjiang v 30. letech. Později s ním naopak útočili Japonci proti Číně v průběhu 2. světové války (Ghabili et al. 2011). Po druhé světové válce je možné k těmto konfliktům zařadit občanskou válku v Jemenu v letech 1963–1967. V ní byl yperit použit Egyptem, který podporoval republikánské síly proti stoupcům staré absolutisticko-teokratické monarchie (Pitschmann 1999).

Jiným příkladem je irácko-iránský konflikt v letech 1983–1988. Během něj použila irácká vojska yperit a další BCHL proti iránským vojákům i proti vlastní populaci Kurdů. K nejhroživější události došlo roku 1988 ve vesnici Halabdža. Bylo zde zabito na 5000 kurdských civilistů a dalších nejméně 7000 bylo přiotráveno (Balali-Mood a Hefazi 2005, Pitschmann 1999). Naposledy byl užit během občanské války v Sýrii (Patočka 2016).

Yperit byl v minulosti aplikován také v experimentech na vojenských dobrovolnících (Ghabili et al. 2011). Tyto experimenty probíhaly například v Anglii nebo v USA. Účelem těchto pokusů bylo testování ochranných prostředků nebo nových léků. V mnoha případech však vyústily v závažné akutní i dlouhodobé zdravotní problémy testovaných subjektů (Dean 2014, Dickerson 2015, Patterson 2005).

3.4 Syntéza

Yperit byl poprvé syntetizován francouzským chemikem Césarem-Mansuètem Despretzem roku 1822. Podstatou této syntézy byla reakce mezi anorganickou sloučeninou – chloridem sirnatým a organickou sloučeninou – ethenem (obr. 1).

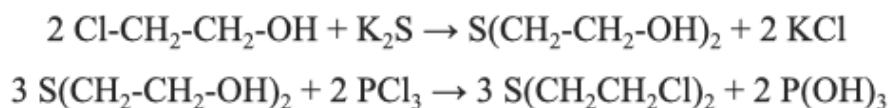


Obr. 1 Syntéza yperitu. Převzato z: Ghabili et al. (2011).

Podobná syntéza byla zopakována o 32 let později Alfredem Richem, ale žádný z obou vědců nepopsal puchýře jako součást jeho vlastností. Vznik puchýřů byl poprvé

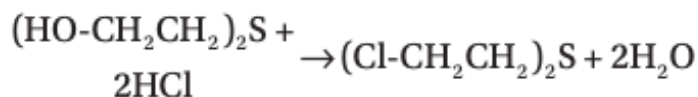
zaznamenán až v roce 1860 Albertem Niemannem a Frederickem Guthrieem. U obou se toxicita této látky projevila až po několika hodinách podrážděním kůže a tvorbou puchýřů, které se velmi špatně hojily a zanechávaly jizvy (Ghabili et al. 2011, Pitschmann 2005).

První syntéza vysoce čistého yperitu byla provedena až roku 1886 německým chemikem Viktorem Meyerem (Kehe a Szinicz 2005, Pitschmann 2005). Jednalo se o dvoustupňový syntetický proces s velmi vysokým výtěžkem (Ghabili et al. 2011). Při této syntéze mezi sebou nejdříve reagují 2-chlorethanol a sulfid draselný za vzniku 2-(2-hydroxyethylsulfanyl)ethanolu a chloridu draselného. 2-(2-hydroxyethylsulfanyl)ethanol dále reaguje s chloridem fosforitým a výsledkem druhého stupně je yperit a hydroxid fosforitý (obr. 2) (Jošt et al. 2018).



Obr. 2 Meyerova syntéza yperitu. Převzato z: Jošt et al. (2018).

Později, roku 1913, Hans Thacher Clark a Emil Fischer modifikovali Meyerovu syntézu. V původní reakci došlo k záměně chloridu fosforitého za chlorovodíkovou kyselinu (HCl), obr. 3. Tato reakce dostala název Meyer-Clarkeho reakce (Ghabili et al. 2011, Jošt et al. 2018). Clark byl kvůli popáleninám, které utrpěl během výrobního procesu rozbitím baňky, hospitalizován po dobu 8 týdnů. Fischerova následná zpráva o nehodě údajně inspirovala Německou chemickou společnost k prvnímu nasazení yperitu jakožto chemické zbraně (Ghabili et al. 2011).



Obr. 3 Meyer-Clarkeho reakce. Převzato z: Ghabili et al. (2011).

3.5 Fyzikální vlastnosti

Yperit je slabě těkavá a olejovitá kapalina, která je ve svém čistém stavu bez barvy a zápachu. V nečistém stavu je pro něj typický česnekový nebo hořčičný zápach a jeho barvy jsou v rozmezí od světle žluté až po tmavě hnědou (Balali-Mood a Hefazi

2005, Kehe et al. 2009). Obvykle je znečištěn vodou nebo HCl a v této formě má korozivní účinek na železo a ocel (Malhotra et al. 1999).

Je vysoce rozpustný v tucích, proto se velmi dobře vstřebává do biologických tkání (Nourani et al. 2016). Jeho rozpustnost ve vodě je naopak velmi slabá (0,007 % při 10 °C). To však postačuje k tomu, aby bylo možné docílit nebezpečných koncentrací v pitné či užitkové vodě. Také se velmi dobře rozpouští v organických rozpouštědlech, palivech, mazivech, kaučuku a sám o sobě je velmi dobrým organickým rozpouštědlem (Balali-Mood a Hefazi 2005, Kassa et al. 1992, Prymula et al. 2002).

Nízká těkavost spolu s nízkou rozpustností ve vodě přispívá k dlouhé perzistenci sloučeniny v bojovém poli. V závislosti na klimatických podmínkách jsou terén a všechny přítomné předměty včetně potravin, porézních materiálů, nátěrů a laků kontaminovány yperitem na velmi dlouhou dobu. Zejména ve studeném a vlhkém podnebí zůstává půda kontaminovaná po dobu několika týdnů (Balali-Mood a Hefazi 2005). Pod zemí může být yperit ve vhodném klimatu aktivní až 10 let (Ghabili et al. 2011). Toxicita yperitu je vyšší při vyšších teplotách, kdy se rozkládá za vzniku toxických sloučenin, včetně aktivních lakrimátorů (Pant a Lomash 2016). Dojde-li k prohřátí kontaminované půdy, yperit se začne odpařovat. Jeho páry se hromadí v blízkosti země, protože jsou asi 5krát těžší než vzduch. To zároveň zvyšuje riziko inhalační otravy (Jošt et al. 2018). Některé z dalších fyzikálních vlastností yperitu, včetně sumárního vzorce, jsou uvedeny v tab. 2.

Ostatní yperity se liší teplotou tuhnutí i dalšími fyzikálními vlastnostmi. Biologické účinky mají ale zhruba podobné (Ghabili et al., 2011). Kvůli vysokému bodu tuhnutí se však spíše, než čistý yperit vytváří pro vojenské aplikace směsi například s oxolovým yperitem, jehož teplota tuhnutí dosahuje až -30 °C, nebo s lewisitem, který má teplotu tuhnutí mnohem nižší (-12 °C). Díky těmto přísadám se dá yperit použít i při nízkých teplotách. Mezi další přísady, které modifikují jeho fyzikální vlastnosti, patří nitrobenzen, tetrachlormethan, Cl_3CNO_2 nebo chlorbenzen (Jošt et al. 2018).

Tab. 2 Sumární vzorec a fyzikální vlastnosti yperitu

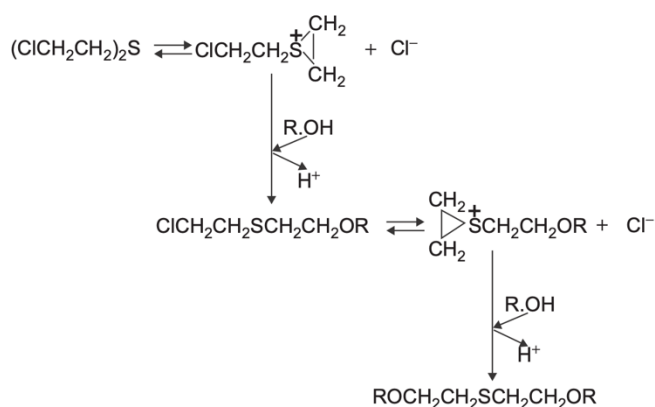
Sumární vzorec	C ₄ H ₈ Cl ₂ S
Bod tuhnutí	13 až 14 °C
Bod varu	215 až 217 °C
Vypařovací tlak	0.72 mmHg (při 20 °C)
Hustota kapaliny	1.274 g.cm ⁻³ (při 20 °C)
Relativní molekulová hmotnost	159.08 g.mol ⁻¹
Stabilita během skladování	stabilní v ocelových a hliníkových nádobách
Korozivní vlastnosti	malé ve vysoce čistém stavu

Modifikováno dle: Balali-Mood and Hefaziho (2005) a Patočky et al. (2004).

3.6 Chemické vlastnosti

Molekula yperitu je symetrická a z chemického hlediska se současně jedná o dihaloalkan i thioether (Jošt et al. 2018). Její reaktivita je dána dvěma chlorethylovými postranními řetězci a centrálním atomem síry s volnými elektronovými páry (Malhotra et al. 1999). Největší polaritu má kovalentní vazba mezi uhlíkem a chlórem, na jejímž rozdělení se podílí síra (Jošt et al. 2018). Oba postranní řetězce mohou kovalentně alkylovat různé molekuly [proteiny, deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) a lipidy] a tento efekt je považován jako hlavní místo destruktivního účinku yperitu (Nourani et al. 2016). Reakce yperitu s těmito molekulami probíhá přes cyklické sulfoniové meziprodukty (Ghabili et al. 2011). V prvním kroku reakce vzniká trojčlenný heterocyklus 1-(2-chlorethyl) thiiranium chlorid, který je z důvodu masivního vnitřního pnutí málo stabilní a velmi reaktivní. Vystupuje jako elektrofil, jenž útočí a alkyluje různé biomolekuly. V druhém kroku dojde k rozevření heterocyklu a k jeho reakci s nukleofilem (například voda nebo alkohol). V případě hydrolýzy dojde v dalším kroku k reakci s vodou a vznikne 2-(2-chlorethylsulfanyl)ethanol. Poté se obě reakce zopakují na druhém postranním alkylovém řetězci. Výsledkem této reakce je 2-(2-hydroxyethylsulfanyl)ethanol neboli thiodiglykol, který nepředstavuje riziko pro lidské zdraví ani životní prostředí (Ghabili et al. 2011, Jošt et al. 2018, Reddy et al. 2005). Celý proces hydrolýzy trvá přibližně 3–5 min. Rychlost hydrolýzy není závislá

na pH a není měněna přítomností iontů, jako je např. Ag^+ nebo Fe^{3+} (Pant a Lomash 2016). Obecné schéma obou reakcí je zobrazeno na obr. 4.

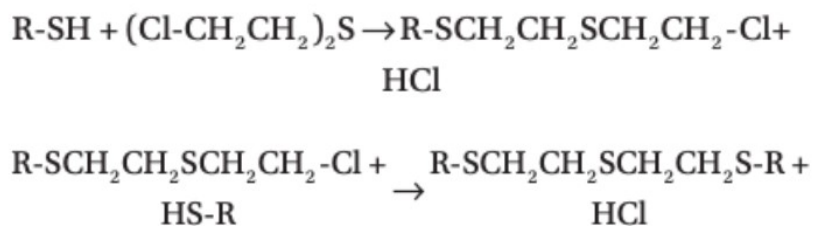


Obr. 4 Obecná schématická reakce yperitu s alkoholem a vodou (pokud $R = H$).

Převzato z: Ghabili et al. (2011).

Intramolekulární cyklizace yperitu na sulfoniový meziprodukt je usnadňována teplem ve vodném prostředí (Ghabili et al. 2011).

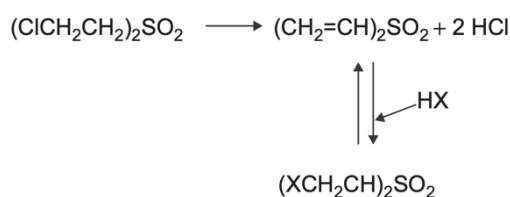
Thioly reagují obdobně. Druhý atom chlóru může reagovat s další molekulou stejného thiolu nebo s novou molekulou, což vede k zesítnění, viz obr. 5 (Ghabili et al. 2011). Produkty této reakce jsou při fyziologickém pH a teplotě vysoce stabilní (Malhotra et al. 1999).



Obr. 5 Obecná reakce yperitu s thiolem. Převzato z: Ghabili et al. (2011).

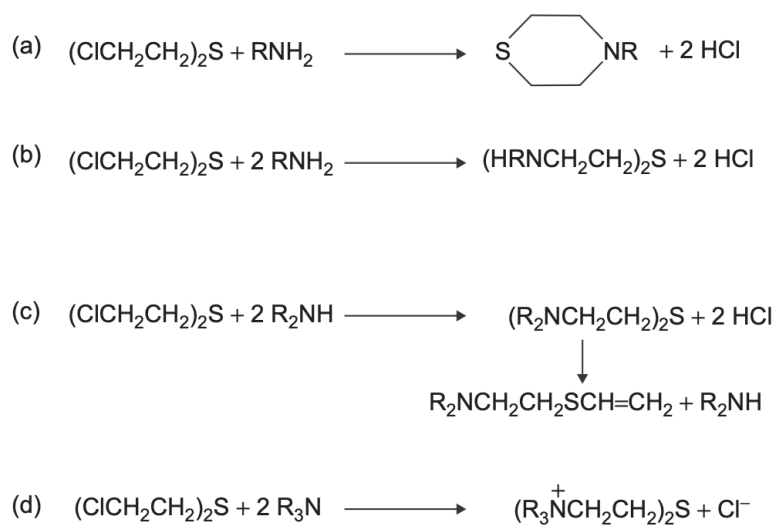
Yperit má tendenci přijímat jeden nebo dva atomy kyslíku. Oxidačními činidly je proto snadno převeden na odpovídající sulfoxid nebo sulfon (Malhotra et al. 1999). Produkty oxidace významně ovlivňují biologickou aktivitu yperitu. Biotransformace yperitu na sulfoxid představuje jeho detoxikaci. Naopak sulfon je citlivý na nukleofilní atak, což ho činí toxickým. Stejně jako mateřská sloučenina má zpuchýřující účinky.

Reakce je znázorněna na obr. 6. Dochází k vyloučení HCl za vzniku divinylsulfonu, který je náchylný ke zmíněnému nukleofilnímu útoku skupinou X (Ghabili et al. 2011).



Obr. 6 Adiční reakce sulfonového derivátu yperitu. Převzato z: Ghabili et al. (2011).

Yperit reaguje s několika dusíkatými sloučeninami za vzniku různých produktů. Díky tomu může chemicky modifikovat proteiny a fosfolipidy. Jedna jeho molekula může reagovat buď s jednou (obr. 7a) či se dvěma (obr. 7b) molekulami amoniaku, nebo primárního aminu. Dále reaguje se dvěma molekulami sekundárního aminu (obr. 7c), přičemž jedna z těchto molekul může být následně eliminována, nebo se dvěma molekulami terciárního aminu (obr. 7d) za vzniku kvartérní amoniové soli (Ghabili et al. 2011).



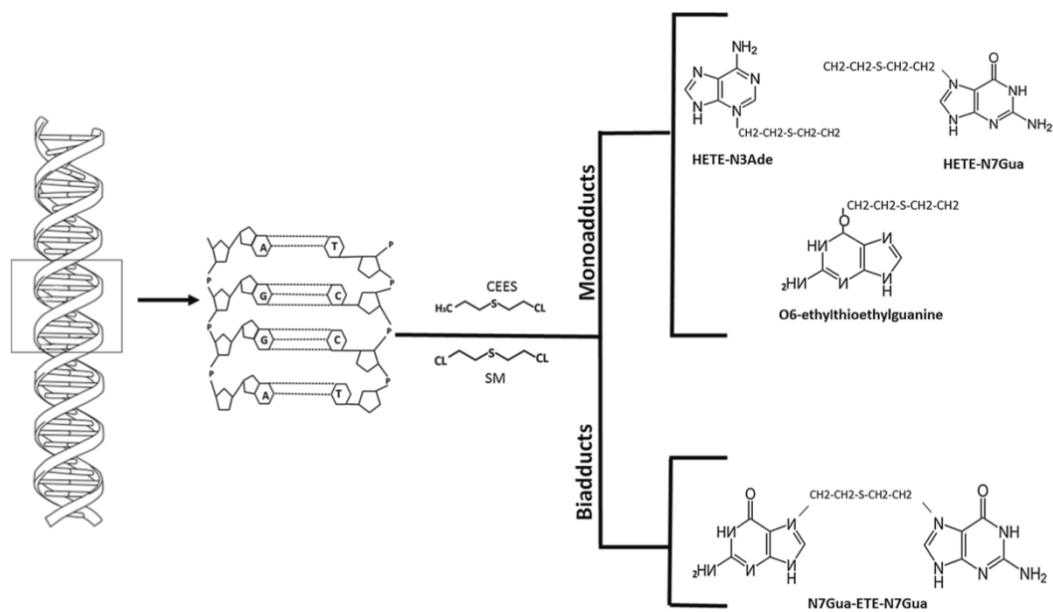
Obr. 7 (a, b, c, d) Reakce yperitu s aminy. Převzato z: Ghabili et al. (2011).

3.7 Mechanismus účinku

3.7.1 Poškození DNA

Molekula DNA je velice citlivá na různé chemické modifikace a stejně jako proteiny, lipidy a RNA je nukleofilním centrem, který se může stát cílem útoku

externích genotoxických elektrofilních sloučenin, jako je yperit (Batal et al. 2013, Noll et al. 2006). Ten může molekulu DNA ovlivnit přímo interakcí s nukleotidy nebo nepřímo ovlivněním replikačních a transkripčních procesů (Masta et al. 1996, Panahi et al. 2018). Yperit interaguje s molekulami DNA za vzniku monoadduktů nebo biadduktů, viz obr. 8.



Obr. 8 Vznik monoadduktů a biadduktů prostřednictvím yperitu a 2-chlorethylethylsulfidu (CEES). Převzato z: Panahi et al. (2018).

Monoaddukty jsou hlavní příčinou poškození DNA. Za toto poškození je zodpovědná alkylace, a to hlavně na N v poloze 7 guaninu. Alkylací vzniká 7N-hydroxyethylthioethylguanin (HETE-N7Gua). Méně často dochází k alkylicaci na N v poloze 1 adeninu za vzniku 1N-hydroxyethylthioethyladenin (HETE-N1Ade), a na N v poloze 3 adeninu, kdy vzniká 3N-hydroxyethylthioethyladenin (HETE-N3Ade). Velmi zřídka dojde k poškození alkylicací na O v poloze 6 guaninu a tvoří se O6-ethylthioethylguanin. Enzym O6-alkylguaninalkyltransferáza, který je zodpovědný za opravu, dokáže toto poškození opravit jen stěží. Důsledkem jsou významné mutagenní účinky (Fidder et al. 1994, Panahi et al. 2018, Pant a Lomash 2016). Neopravené monoaddukty mohou reagovat s proteiny a s bázemi na stejném nebo komplementárním řetězci DNA, což vede k zesílení. Výsledkem je zvýšení mutagenity DNA a zabránění separace řetězců. Tato blokáce může způsobit zastavení procesu transkripce a replikace nebo může vést k buněčné smrti (Noll et al. 2006, Panahi et al. 2018).

Biadukty jsou zodpovědné téměř za 17 % poškození DNA. Jejich prostřednictvím dochází k vnitřetěžcovému a meziřetěžcovému zesílení za vzniku bis-(7N-guaninethyl)sulfidu (N7Gua-ETE-N7Gua). Snahou buňky opravit biadukty často také dochází ke vzniku dvojíých zlomů (DSBs) DNA. Jedná se o nejnebezpečnější poškození vedoucí ke ztrátě správné šablony, podle které se DNA může opravit (Panahi et al. 2018).

Vzhledem k alkylačním schopnostem yperitu je velká pravděpodobnost, že se u osob po expozici zvýší riziko výskytu rakoviny (Rowell et al. 2009). Nárůst rizika kancerogeneze byl pozorován i u zvířat (Panahi et al. 2015).

3.7.2 Reparace genetického poškození indukovaného yperitem

V návaznosti na změny DNA vyvolané yperitem se buňky poškození genetického materiálu snaží nejprve reparovat. V této fázi proto rekrutují kinázy příbuzné s fosfatidylinositol-3-kinázami, jako je proteinová kináza mutovaná u onemocnění ataxia telangiectasia (ATM) a proteinová kináza příbuzná proteinům ATM a Rad3 (ATR). Obě kinázy regulují kontrolní body buněčného cyklu, které jsou aktivovány při poškození DNA. Činnost ATM je zahájena při vzniku DSBs DNA, zatímco ATR je aktivována zejména jednoduchými zlomy. Signální transdukcce indukovaná ATM a ATR může aktivovat kontrolní kinázu 1 (Chk1) a kontrolní kinázu 2 (Chk2). Tyto kinázy působí jako mitotické regulátory a jsou schopny zabránit buněčnému dělení (Panahi et al. 2018, Tewari-Singh et al. 2010).

Zvláště důležitým substrátem ATM je protein o molekulové hmotnosti 53 kD (p53), který je aktivován fosforylací. Jedná se proapoptický mediátor, jehož transkripce je podporována tumor nekrotizujícím faktorem α (TNF α) přes extracelulární signálem regulované kinázy (ERK) a c-Jun-N-terminální kinázy (JNK) (Ghabili et al. 2011). Studie prokázaly, že existuje jasný vliv dávek stresu na hladiny p53, přičemž projevem stresu je poškození DNA (Nishizuka et al. 2008). Fosforylovaný p53 je schopen zastavit buněčný cyklus v interfázi, čímž dává buňce příležitost opravit poškozenou DNA a zabraňuje tak přechodu poškozené DNA na další generaci buněk. Normální buněčný cyklus bude pokračovat po dokončení opravy. Nicméně dojde-li k selhání opravy, p53 iniciuje jednu z cest apoptózy (Ghabili et al. 2011, Nourani et al. 2016, Panahi et al. 2018). Yperit způsobuje hromadění a aktivaci p53 v lidských keratinocytech. Mutace

tohoto proteinu se vyskytly například u bývalých zaměstnanců závodů na jeho výrobu, kteří trpěli rakovinou plic (Ghabili et al. 2011).

3.7.3 Možnosti reparace poškozené DNA

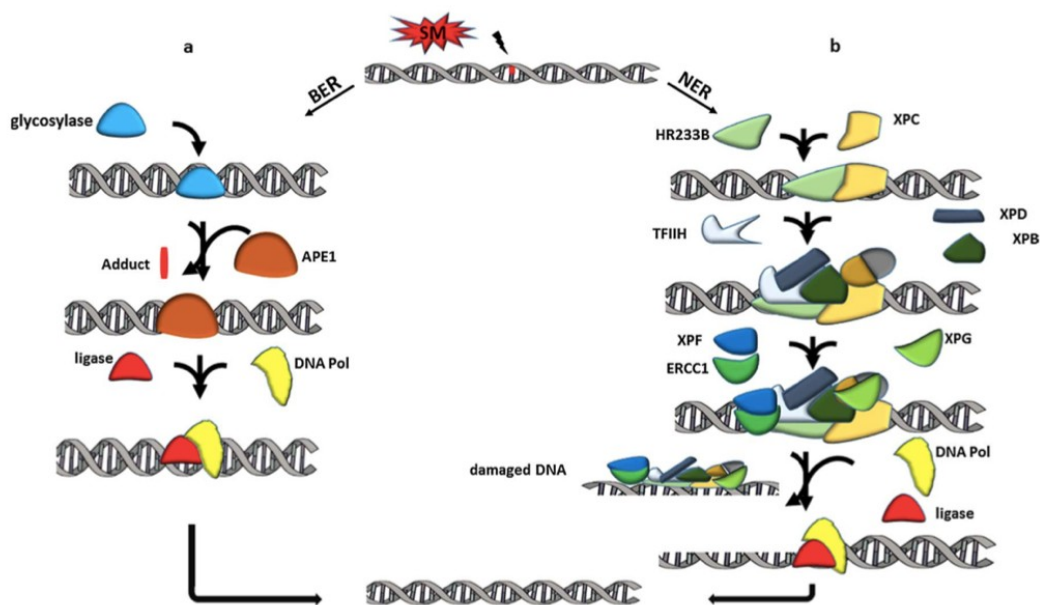
3.7.3.1 Oprava DNA monoaduktů

Yperit je schopen produkovat DNA monoadukty mající velmi podobnou strukturu jako ty, které mohou být vytvořené CEES (Jowsey et al. 2009). Do procesu opravy DNA léze vyvolané yperitem jsou zapojeny dvě dráhy – bázo­vá excizní reparace (BER) a nukleotidová excizní reparace (NER) (Jowsey et al. 2012). Stále ale není jasné, jestli buňky při opravě monoaduktů používají obě dráhy (NER i BER) nebo pouze jednu z nich (Panahi et al. 2018).

Rozsáhlé adukty DNA využívají k opravě dráhu NER. Mimo yperitu je jejich vznik možné pozorovat po působení ultrafialového (UV) záření (fotoprodukty a cyklobutan-pyrimidinové dimery), po expozici aflatoxinu, benzo[a]pyrenu nebo jiných genotoxických látek (Christmann et al. 2003). Tato dráha se skládá z několika sekvenčních procesů a je zahájena tvorbou heterodimerního komplexu proteinů xeroderma pigmentosum C a homologní rekombinace 233 B (XPC-HR233B), který se poté váže na místo poškození a rekrutuje transkripční faktor RNA polymerázy II (TFIIH) (Panahi et al. 2018). Tento faktor se skládá z 10 podjednotek, mezi něž patří také helikázy xeroderma pigmentosum B a D (XPB a XPD). Jejich prostřednictvím dojde k rozvolnění struktury DNA v místě poškození (Rimel a Taatjes 2018). Následuje rekrutování replikačního proteinu A (RPA), proteinů xeroderma pigmentosum A, F a G (XPA, XPF a XPG) a proteinu excizní opravy křížové komplementace skupiny 1 (ERCC1). Jejich pomocí tak dochází k incizi poškozené DNA. Následuje syntéza nové DNA pomocí DNA polymerázy a její ligace, která je katalyzována DNA ligázou I (obr. 9b) (Panahi et al. 2018).

Na začátku BER dochází k rozpoznání lézí specifickou DNA glykosylázou. Hlavními lézemi, které jsou touto reparační dráhou opravovány, jsou oxidované báze DNA, které vznikají spontánně během zánětu nebo při vystavení exogenním látkám, ionizujícímu záření a UV záření. BER je však aktivovaná také alkylacemi DNA indukovanými endogenními alkylačními látkami a exogenními karcinogeny, jako jsou nitrosaminy nebo různé protirakovinné léky, jako je dakarbazin a temozolomid (Christmann et al. 2003). Po rozpoznání lézí naruší apurinová-apyrimidinová

endonukleáza 1 (APE1) strukturu DNA tak, aby došlo ke vzniku jednořetězcového zlomu, po kterém následuje syntéza a ligace DNA (obr. 9a). Při BER sehrává důležitou roli rovněž poly(ADP-ribóza)polymeráza (PARP-1). U PARP-1 deficitních buněk je opětovné spojování řetězcových zlomů zpomaleno. V důsledku toho jsou tyto buňky citlivé na léze, které by měly být opraveny pomocí BER Panahi et al. (2018).

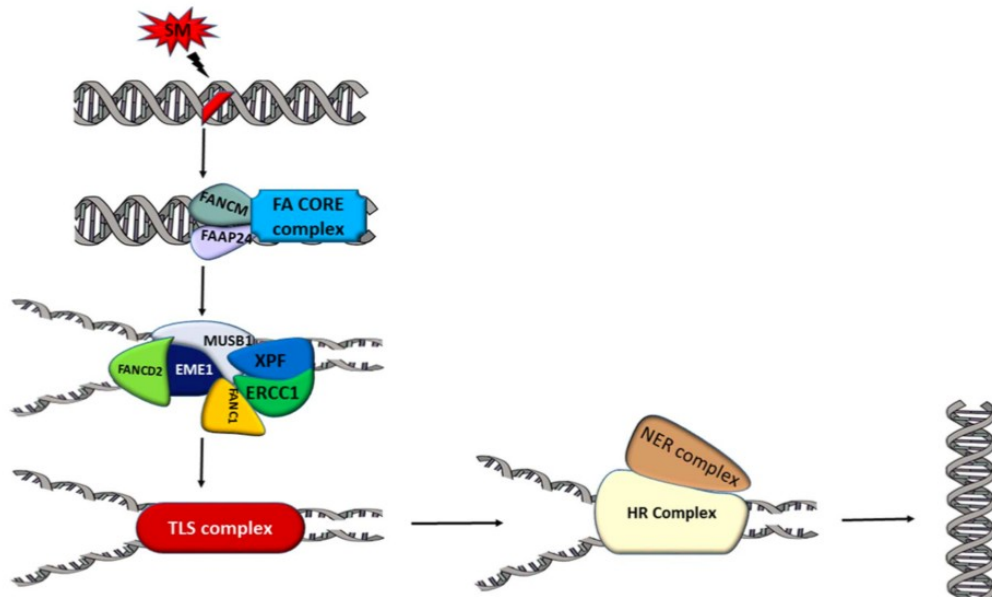


Obr. 9 (a, b) Mechanismus opravy DNA monoadduktů pomocí BER a NER. Převzato z: Panahi et al. (2018).

3.7.3.2 Oprava zesítné DNA

Jedná se o složitý proces, kterého se účastní také proteiny jiných reparačních drah. Jedná se například o endonukleázy Mus81 a Eme1, tumorový supresor BRCA2 a protein RAD51, které jsou součástí homologní rekombinace (HR). Odstranění meziřetězcových vazeb je závislé na po sobě jdoucích akcích proteinů dráhy NER, které způsobují incizi v jednom z poškozených řetězců. Následně dojde k odstranění fragmentu a vzniklý „výřez“ se vyplní mechanismy HR (obr. 10). Existuje jen málo studií, jež popisují opravu zesíťovaných vazeb po expozici yperitem, neboť veškerá pozornost byla doposud soustředěna na opravné dráhy HR a NER. V buňkách na druhou stranu existují i další opravné cesty, na kterých se podílí například komponenty dráhy Fanconioho anémie nebo mismatch oprav. Protein D2 je klíčovým faktorem dráhy Fanconioho anémie (FANCD2), jenž by ve své ubikvitylované formě podporuje vazbu endonukleáz do místa lézí, a to za účelem incize a uvolnění meziřetězcových zesítní. Připojený fragment pak může být podroben další incizi proteiny NER, což může

způsobit uvolnění duplexního fragmentu obsahujícího zesítené adukty. Na opravě zesíťovaných vazeb by se stejně tak mohla podílet translační syntéza (TLS) (Panahi et al. 2018).



Obr. 10 Mechanismus opravy zesítené DNA. Převzato z: Panahi et al. (2018).

3.7.3.3 Oprava dvojitých zlomů DNA

DSBs vznikají současným přerušením obou komplementárních řetězců dvoušroubovice DNA (Jackson 2002). DSBs jsou zvláště nebezpečnou hrozbou pro stabilitu genomu, neboť následkem mohou být chybějící genetické informace. K tomu jsou však náchylné i určité druhy oprav obou zlomených konců. I přesto je ale jejich oprava vhodnější než ponechání zlomených konců, neboť by došlo k hlubší změně genomu (Wyman a Kanaar 2006).

Existují dvě hlavní opravné cesty, výše zmíněná HR a nehomologní spojování konců (NHEJ), a jedna vedlejší opravná cesta označovaná jako single-strand annealing (SSA) (Panahi et al. 2018; Valerie a Povirk 2003). U jednoduchých eukaryot, jako jsou kvasinky, je HR hlavní opravnou dráhou, naopak u savců dominuje NHEJ. Jejich výběr závisí také na fázi buněčného cyklu. NHEJ se vyskytuje hlavně v G_0 nebo G_1 fázi. HR vyžaduje přítomnost komplementárního řetězce DNA, proto se vyskytuje pouze v S a G_2 fázi buněčného cyklu (Christmann et al. 2003). Jowsey a kol. (2012) zjistili, že HR hraje významnější roli při reparaci buněk zasažených yperitem než dráha NHEJ.

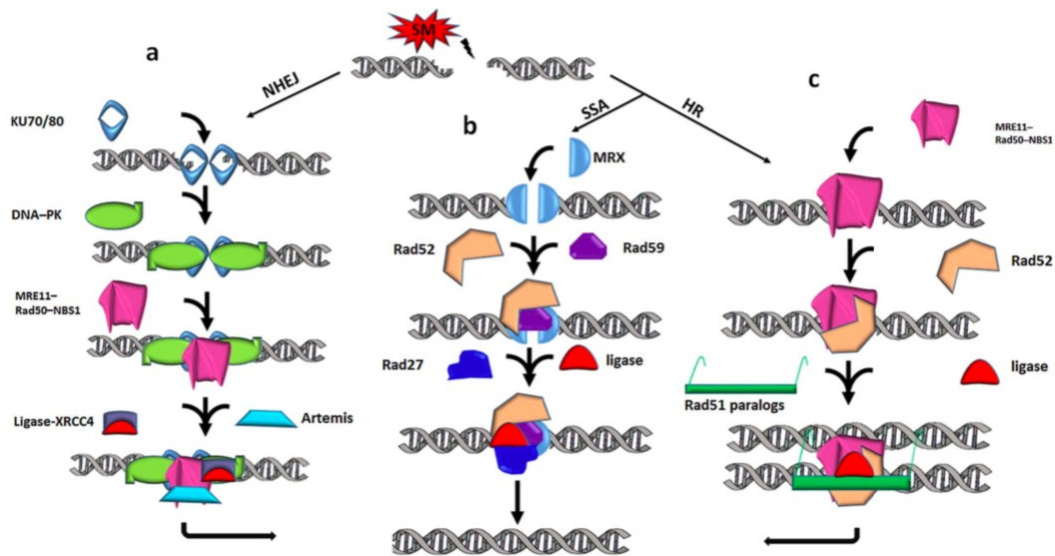
Neschopnost opravit DSBs nebo nesprávný způsob opravy mohou vést k různým chromozomovým aberacím, jako jsou inserce, delece nebo translokace. To může zvýšit náchylnost buňky ke vzniku rakoviny nebo naopak indukovat buněčnou smrt. Lze tedy předpokládat, že HR, NHEJ a SSA vzájemně spolupracují na opravě DSBs (Panahi et al. 2018, Shrivastav et al. 2008). Celý proces začíná fosforylací histonu gama-H2AX, ke které dochází v místě zlomu a vytváří rozpoznávací doménu pro další reparační proteiny (Panahi et al. 2018).

V opravném systému NHEJ se oba konce zlomů ligují bez homologických sekvencí sloužících jako templát opravy. Prvním krokem je rozpoznání a navázání heterodimerního komplexu, který se skládá z proteinů Ku70 a Ku80, na poškozenou DNA. Díky tomu je DNA ochráněna před aktivitou exonukleáz. Následně se na tento komplex navážou kinázové katalytické podjednotky, čímž se vytváří aktivní holoenzym DNA dependentní proteinová kináza (DNA-PK). V místě DSBs vykazuje DNA-PK aktivitu jako serin/threonin kináza a vede k aktivaci proteinu XRCC4. Výsledkem je vytvoření stabilního komplexu s DNA ligázou IV, který spojuje zlomené konce řetězců dohromady. Před jejich spojením může dojít k úpravě DSBs na jejich koncích komplexem MRE11-Rad50-NBS1 (MRN komplex), jenž vykazuje exonukleázovou, enonukleázovou a helikázovou aktivitu. Úpravy konců zprostředkovává také jednovláknová specifická exonukleázova Artemis, jejíž aktivita je rovněž regulována fosforylací DNA-PK (obr. 11a) (Christmann et al. 2003).

V případě HR dochází k výměně DNA mezi poškozenými a nepoškozenými chromozomy. Sdílené homologické sekvence tak slouží jako šablona pro opravu. HR začíná nukleolytickou resekci DSBs MRN komplexem. Následuje vytvoření jednořetězcových DNA, jež se vážou na kruhový komplex tvořený proteiny Rad52, který je chrání před exonukleotickým štěpením. Rad52 interaguje s Rad51, jenž katalyzuje výměnu řetězce s komplementárním řetězcem, ve kterém se poškozená vlákna vážou na nepoškozenou DNA. Sestavení nukleoproteinového vlákna Rad51 je usnadněno různými paralogy proteinu Rad51, jako jsou Rad51B, Rad51C a Rad51D, XRCC2 a XRCC3. Syntéza DNA probíhá podle nepoškozeného řetězce a proces opravy je dokončen ligací (obr. 11c) (Christmann et al. 2003).

V opravném procesu DSBs hraje důležitou roli i vedlejší dráha SSA, a to zejména u savčích buněk obsahujících opakující se DNA. SSA pravděpodobně začíná produkcí převisů jednotlivých řetězců na koncích DNA, ke kterým dochází vlivem

exonukleáz nebo helikáz. Následuje spojení homologních míst v převislých řetězcích a ligace poškozeného místa (obr. 11b) (Panahi et al. 2018, Valerie a Povirk 2003).



Obr. 11 (a, b, c) Mechanismus opravy DSBs DNA. Převzato z: Panahi et al. (2018).

3.7.4 Oxidační stres

Dalším mechanismem, jehož prostřednictvím vyvolává yperit poškození buněk, je oxidační stres. Oxidační stres představuje nerovnováhu mezi reaktivními formami kyslíku (ROS) a antioxidanty, která vede k vážnému selhání biologických funkcí, eventuálně smrti buněk. Mezi vysoce reaktivní sloučeniny patří zejména superoxidový aniont ($O_2^{\cdot-}$) a hydroxylový radikál. Ve vysokých koncentracích modifikují makromolekuly buněk, jako lipidy, proteiny a DNA (Tahmasbpour et al. 2015). Yperit ovlivňuje i vznik reaktivních forem dusíku (RNS). ROS i RNS hrají klíčovou roli v rozvoji akutních i chronických účinků po expozici yperitem (Ghabili et al. 2011, Nourani et al. 2016). K jejich vzniku dochází vyčerpáním zásob intracelulárních antioxidantů, poškozením respiračního systému vedoucího k mitochondriálním dysfunkcím nebo rozvojem zánětu se zvýšenou hladinou oxidu dusnatého (NO) (Tahmasbpour et al. 2015).

NO je silný antioxidant inhibující degranulaci žírných buněk a uvolňování histaminu během zánětu (Paromov et al. 2007). V buňkách je produkován pomocí NO syntáz (NOS), které přeměňují L-arginin na NO a L-citrulin. Tyto syntázy se vyskytují ve třech isoformách: endoteliální NOS (eNOS), indukovatelné NOS (iNOS) a neuronální NOS (nNOS). eNOS společně s nNOS jsou exprimovány konstitutivně,

zatímco iNOS jsou indukovány cytokiny ve stresových situacích (Nourani et al. 2016, Pant a Lomash 2016). Zvýšená aktivita iNOS vyvolává nadměrnou produkci NO v lidských tracheobronchiálních a epitelálních buňkách dýchacích cest po expozici yperitu (Ghabili et al. 2011). NO zde následně podporuje rozvoj zánětu a apoptózu buněk. I když je NO silným antioxidantem, může reagovat se superoxidovým aniontem za vzniku silného a stabilního oxidantu peroxynitritu (Nourani et al. 2016). Tento oxidant může interagovat s biomolekulami a způsobit vyčerpání zásob antioxidantů, peroxidaci lipidů a poškození DNA (Tahmasbpour et al. 2015). Zvýšené intracelulární hladiny glutathionu (GSH) naopak tlumí apoptózu zprostředkovanou NO (Nourani et al. 2016). V lidských epidermálních keratinocytech yperit expresi iNOS potlačuje. Tímto účinkem může být vysvětleno zpožděné hojení ran vyvolaných touto látkou (Ishida et al. 2008). Studie obětí irácko-iránského konfliktu na druhou stranu odhalila zvýšené hladiny oxidu dusnatého v séru u pacientů s pozdními dermatologickými komplikacemi (Ghabili et al. 2011).

Yperit napadá i různé antioxidantní enzymy, jako jsou GSH-reduktáza, GSH-peroxidáza, GSH-S-transferáza, NADPH-cytochrom P450 reduktáza, thioredoxinreduktáza, superoxidodismutáza (SOD) a katalázy. Tyto enzymy jsou klíčové pro udržení rovnováhy antioxidantů. GSH-reduktáza redukuje oxidovaný GSH pomocí NADPH zpět na GSH. U zasažených osob byl tento enzym mnohem méně aktivní. GSH-peroxidáza využívá GSH k inaktivaci peroxidu vodíku, čímž zabraňuje jeho oxidačnímu účinku. GSH-S-transferázy naopak detoxikují různé endogenní a exogenní sloučeniny. Chrání biomolekuly před reaktivními elektrofilny, a tím například snižují pravděpodobnost peroxidace lipidů a apoptózy ve stěnách dýchacích cest u pacientů vystavených yperitu. NADPH-cytochrom P450 reduktáza chrání plicní epitelální buňky před yperitem a jeho metabolity. SOD je zaměřena proti superoxidovému radikálu, který je hlavním představitelem ROS tvořeným v mitochondriích. Katalázy rozkládají peroxid vodíku na kyslík a vodu, čímž, podobně jako GSH-peroxidáza, přispívají k ochraně buněk před peroxidem vodíku (Tahmasbpour et al. 2015). Jafari (2007) na modelu potkanů prokázal, že působení yperitu v dávkách vyšších než 10 mg/kg významně snižuje aktivita SOD, GSH-peroxidázy, katalázy a GSH-S-transferázy v játrech a mozku. Zároveň klesla i aktivita GSH-reduktázy v játrech, což bylo spojeno s vyčerpáním GSH a zvýšením hladiny malonyldialdehydu (MDA) jakožto vedlejšího

produktu peroxidace lipidů. Nižší aktivita SOD byla prokázána i u pacientů s dušností anebo chronickým kašlem po expozici yperitu (Ghabili et al. 2011).

Mezi ukazatele oxidačního stresu řadíme jednak samotné antioxidanty a antioxidační enzymy, ale také biomolekuly, převážně DNA, lipidy a proteiny, modifikované interakcemi s ROS a jejich metabolity (Matoušková et al. 2014, Tahmasbpour et al. 2015). Převládajícím a stabilním biomarkerem ze všech produktů oxidace DNA je 8-hydroxydeoxyguanosin. Vzniká oxidací guaninu na uhlíku v poloze 8 (Tahmasbpour et al. 2015). Výsledkem peroxidace lipidů jsou produkty, jejichž rozkladem dochází k tvorbě mnoha reaktivních aldehydů, jako je MDA a 4-hydroxynonenal (Tahmasbpour et al. 2015). ROS způsobuje i peroxidaci kyseliny arachidonové za vzniku prostaglandinových sloučenin isoprostanů (Niki 2014). V plicní tkáni myši a v plazmě lidí, kteří byli vystaveni yperitu, byly naměřeny vysoké hodnoty MDA (Shohrati et al. 2010, Tahmasbpour et al. 2015). U krys exponovaných CEES byla v plicní tkáni zaznamenána vysoká koncentrace 4-hydroxynonenalu (O'Neill et al. 2010). Nejdůležitějším ukazatelem, který hodnotí oxidační poškození proteinů po expozici yperitu, je u pacientů s poškozením plic protein karbonyl. V plicní tkáni lze měřit i další markery oxidačního stresu, jako je aktivita iNOS, hemoxygenázy 1, SOD, katalázy, GSH-peroxidázy nebo deplece GSH (Tahmasbpour et al. 2015).

3.7.5 Buněčná smrt

K buněčné smrti může dojít během akutní fáze prostřednictvím apoptózy, která je považována za časnou reakci na expozici yperitu. Naopak při vysokých koncentracích dochází k nekróze (Nourani et al. 2016).

Kritický faktor, jenž rozhoduje mezi zahájením apoptózy a nekrózy je PARP. Vlivem poškození DNA dochází k aktivaci PARP. Mírná expozice yperitu aktivuje PARP-1 a stimuluje opravu DNA. Pokud nelze poškozenou DNA opravit, buňka zahájí apoptózu, a to díky částečně zachované hladině adenosintrifosfátu (ATP). Vysoká koncentrace a nadměrná stimulace PARP vede k depleci nikotinamidadeninukleotidu (NAD^+). Nízká hladina NAD^+ dále inhibuje spotřebu glukózy a resyntéza NAD^+ přispívá k vyčerpávání zásob ATP. Klesající hladiny ATP mohou vést k nekróze. Apoptotická odpověď může být zeslabena chelatací vápenatých kationtů. Naopak inhibice PARP je schopna přepnout nekrózu na apoptózu (Kehe et al. 2008, Kehe a Szincz 2005, Pant a Lomash 2016).

3.7.5.1 Apoptóza

Apoptóza může být vyvolána vnitřní (mitochondriální) cestou nebo vnější cestou aktivací receptorů buněčné smrti (Ghabili et al. 2011). U pacientů, kteří byli vystaveni yperitu, může být vyvolána několika faktory, včetně přímé interakce yperitu s DNA, signálními molekulami, oxidačním stresem nebo produkcí NO. Apoptické buňky v konečných stádiích uvolňují na svém povrchu signály, jako je fosfatidylserin, jež jsou identifikovatelné fagocytárními buňkami (makrofágy) (Nourani et al. 2016). Následně jsou tyto buňky odstraněny procesem zvaným efferocytóza (Vandivier et al. 2006).

Klíčovými enzymy regulujícími vnější i vnitřní cesty apoptózy jsou kaspázy. Vnější dráhu apoptózy spouštějí faktory, jako je tumor nekrotizující faktor vazbou se svým receptorem. Jejich prostřednictvím je aktivována kaspáza-8, která následně aktivuje další efektorové kaspázy, včetně kaspázy-3. Aktivní kaspáza-3 dále degraduje buněčné proteiny nezbytné pro udržení integrity buněk. Aktivní kaspáza-8 přispívá i k uvolňování cytochromu C z mitochondrií. Na této úrovni a aktivací efektorových kaspáz se obě apoptotické cesty propojují (Garrido et al. 2006, Nourani et al. 2016).

V případě vnitřní apoptotické dráhy nicméně dochází k uvolnění cytochromu C z mitochondrií nezávisle na aktivitě kaspázy-8. Silným regulátorem tohoto procesu je například protein p53. Jeho prostřednictvím dochází k aktivaci pro-apoptotických signálů nebo naopak k inhibici anti-apoptotických signálů, které v konečném důsledku otevírají kanály mitochondrií uvolňující cytochrom C. Cytochrom C interaguje s apoptotickou proteázou aktivující faktor 1 (APaf-1) a ATP. Tento komplex se poté váže na prokaspázu-9 a vytváří kvartérní proteinovou strukturu zvanou apoptosom, v němž se prokaspáza-9 automaticky štěpí. Aktivovaná kaspáza-9 poté aktivuje kaspázu-3 (Marchenko a Moll 2014, Nourani et al. 2016, Schuler et al. 2000).

Yperit indukuje apoptózu v epiteliálních a subepiteliálních vrstvách buněk a v bazálních vrstvách epidermis (Nourani et al. 2016). Rosenthal et al. (1998) pozorovali v keratinocytech ovlivněných 100–300 μM yperitu indukci p53, redukcí anti-apoptotického Bcl-2 a aktivaci kaspázy-3. V dýchacích cestách byla naopak pozorována přímá aktivace signální dráhy indukující kaspázu-8 a úbytek epitelových buněk bronchů a malých dýchacích cest. Dochází zde také k několikanásobnému zvýšení hladiny celkového proteinu v bronchoalveolární laváži, který představuje ukazatel poškození epitelu (Malaviya et al. 2010). Apoptóza je také odpovědná za vznik lézí, které se vyskytují v dýchacích cestách v řádech měsíců po expozici,

a vysvětluje také účinky vysokých dávek yperitu na gastrointestinální trakt (Ghabili et al. 2011).

3.7.5.2 Nekróza

Vystavení epitelálních vrstev vysokým dávkám yperitu způsobuje rozsáhlou nekrózu a následně uvolnění buněčného obsahu, který vyvolá zánět (Nourani et al. 2016). Mírná dermální a epidermální nekróza je spojena s kožními lézemi. K epidermální a folikulární nekróze dochází během několika hodin po expozici a jsou doprovázeny intracelulárním edémem. K nekróze jsou náchylnější víc melanocyty než keratinocyty. Na nekrotické buněčné smrti se po expozici yperitu může podílet vznik ROS, protein p53 a indukce katepsinu Q. Takovýto proces pak označujeme „naprogramovanou nekrotickou smrtí“ (Ghabili et al. 2011).

3.8 Klinický obraz při akutní intoxikaci

Akutní toxické účinky se obvykle objevují po různě dlouhých a bezpříznakových obdobích latence. Délku latence ovlivňuje dávka yperitu, způsob expozice, teplota prostředí, skupenství yperitu a pravděpodobně závisí na samotném jedinci (Balali-Mood a Hefazi 2005, Jošt et al. 2018, Kehe a Szinicz 2005).

Toxicita yperitu se zvyšuje s rostoucí teplotou a vlhkostí okolí. Akutní toxické účinky se proto projeví nejrychleji na vlhkých a teplých místech živého organismu. Příkladem jsou sliznice, kůže bohatá na mazové a potní žlázy (např. podpaží, šourek, anální oblast) a kožní místa, která jsou často mechanicky drážděna (Jošt et al. 2018, Kassa et al. 1992, Kehe a Szinicz 2005).

Lidé vystavení nízkým dávkám yperitu zřídka trpí okamžitými příznaky a kontaminované části těla se mohou zdát poměrně dlouho normální. Jde však o kumulativní jed, takže oběti mohou nevědomky dostávat rostoucí a nakonec velmi vysoké dávky (Ghabili et al. 2010).

3.8.1 Oči

Výrazná precitlivělost očí vůči toxickým účinkům yperitu souvisí hlavně s intenzivní metabolickou aktivitou epitelálních buněk rohovky a se snadnou penetrací této látky přes slizovitě-vodní povrch rohovky a spojivky (Etehad-Razavi et al. 2006).

O tom, jak závažné bude poškození zraku, rozhodne dávka a doba expozice plynnému yperitu. Uzdravení může přitom trvat i několik let (Ghasemi et al. 2008).

Otrava nízkými dávkami ($12\text{--}70 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$) se nejčastěji projeví akutním zánětem spojivek. Pacient pocítuje přítomnost cizího tělesa v oku, trápí ho bolestivost, podráždění, slzení a dochází k lokální hyperémii. Dojde-li krátce po expozici k pocitu pálení, mohou za to zpravidla nečistoty yperitu nebo prach na bojišti. Tento stav kompletně vymizí v průběhu několika dní (Ghabili et al. 2010, Kehe a Szinicz 2005, Wattana a Bey 2009).

Při vyšších dávkách, $100\text{--}200 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$, dochází k poškození očních víček a rohovky. Dávky nad $200 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ se projevují poškozením limbálního cévního zásobení a hlubších vrstev rohovky, což vede k dočasné slepotě (Ghabili et al. 2010, Javadi et al. 2005). Do 2 až 6 hodin se u zasažených vyskytuje silná bolestí očí, fotofobie, nadměrné slzení, blefarospasmus a otok očních víček (Balali-Mood a Hefazi 2005). Z patologického hlediska dochází k poranění epitelu a endotelu a k edému *substantia propria* rohovky (Ghabili et al. 2010).

Dávky vyšší než $400 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ způsobují poškození rohovky v plné tloušťce. Dochází k chemické přední uveitidě, která je doprovázená synechiemi a kataraktou. Může dojít i k přechodnému zvýšení nitroočního tlaku. Na očním víčku se mohou vyskytnout popáleniny 1. i 2. stupně. Většina postižených se uzdraví, ale rohovka zůstane zakalená. Ve výjimečných případech může dojít až k perforaci rohovky (Ghabili et al. 2010, Vidan et al. 2002). Masivně poškozené oko může vyvolat těžký zánět rohovky, jenž může vést k vytvoření vředu v rohovce nebo k iritidě. V extrémních situacích může dojít k panoftalmii, která obvykle vede až ke ztrátě celého očního bulbu (Patočka et al. 2004).

Mírné a středně těžké léze obvykle končí úplným zotavením (Javadi et al. 2005). Během 48 až 72 hodin dochází postupně ke spontánnímu hojení, a to i bez léčení (Vidan et al. 2002). Epitel rohovky je zhojen do týdne (Ghabili et al. 2010). K úplnému symptomatickému zotavení dochází v průběhu šesti týdnů nebo i déle (Balali-Mood a Hefazi 2005). Ke kompletnímu uzdravení může dojít i u těžkých lézí, zpravidla však u nich určité poškození přetrvává (Javadi et al. 2005).

3.8.2 Kůže

Akutní kožní léze můžeme klasifikovat následovně: erytematózní forma, pigmentová exfoliace, povrchní vezikulární až bulózní forma, bulózní nekrotizace, hluboká nekrotizující nebulózní forma a alergické a toxické kontaktní reakce kůže (Balali-Mood a Hefazi 2005).

Při expozici kůže dochází zpravidla během 2 až 8 hodin k erytému, jenž je doprovázen extrémním svěděním a pálením (Balali-Mood a Hefazi 2005, Ghabili et al. 2010, Wattana a Bey 2009). Zhruba po 18 hodinách se v oblasti erytému tvoří subepidermální puchýře (malé vezikuly), které bývají bolestivé jen zřídka. Výjimkou jsou případy, kdy se tvoří nad klouby a brání tak pohybu. Třením puchýřů může být vyvolána tvorba puchýřů nových. Tento stav označujeme jako pozitivní Nikolskyho příznak, který značí poškozenou bazální membránu (Ghabili et al. 2010). Puchýře jsou obvykle tenkostěnné a naplněné čirou žlutou tekutinou, která není toxická (Kehe et al. 2008, Wattana a Bey 2009). Později se tyto puchýře mohou spojit a vytvořit větší tzv. „bull“ (obr. 12) (Kehe a Szinicz 2005). Celý tento proces trvá většinou okolo 4 až 6 dní (Kassa et al. 1992).



Obr. 12 Tvorba bull na levé ruce. Převzato z: Chivers (2014).

Velké puchýře se obvykle roztrhají, což vede k úplné ztrátě kůže a ke vzniku kožních vředů. Na těchto místech se může vytvořit nekrotická vrstva, jež bývá následovaná tvorbou escharů. Ty se během 4 až 6 dnů odloupnou a na stejném místě se vytvoří jizva, která je dlouhodobě doprovázena zvýšenou pigmentací v okolí

(Balali-Mood a Hefazi 2005). Vysoké dávky yperitu mohou způsobit velmi bolestivé popáleniny (Ghabili et al. 2010).

K zahojení erytému dochází v průběhu pár dní, aniž by způsobil skutečnou vadu kůže. Celková doba hojení vezikulární/bulózní formy po mírné expozici trvá 4–6 týdnů. Dojde-li však k těžkým lézím, tato doba se může protáhnout až na několik týdnů (obvykle 6–12 týdnů). Místa zahojených lézí jsou velmi citlivá na mechanické poškození (Balali-Mood a Hefazi 2005, Jošt et al. 2018, Patočka et al. 2004, Wattana a Bey 2009). Ve zhojené části dochází vlivem destrukce melanocytů k hypopigmentaci, naopak oblast obklopující původní lézi se stává vzhledem ke stimulaci melanocytů hyperpigmentovanou. Může se navíc jednat o trvalý stav (Balali-Mood a Hefazi 2005, Ghabili et al. 2010).

Další vážně poškozenou strukturou kůže je kolagen. Nedávné experimenty navíc ukázaly, že kolagenáza není schopna degradovat yperitem modifikovaný kolagen, a to i přes její zvýšenou hladinu (Pohanka 2012b).

3.8.3 Respirační systém

Symptomy související s poškozením respiračního systému se obvykle objevují po očních příznacích, ale dříve než kožní léze (Balali-Mood a Balali-Mood 2009). Zasaženy mohou být různé části dýchacího systému počínaje nosní sliznicí až po terminální bronchioly (Balali-Mood a Hefazi 2005). Patologickou sekvenci akutních účinků můžeme rozdělit do 4 fází: katarální stádium, pseudomembranózní laryngotracheitida, pseudomembranózní bronchitida a bronchopneumonie a vznik plicních abscesů nebo gangrény (Kehe et al. 2008).

Nízké inhalační dávky yperitu ($12\text{--}70 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{m}^3$) mohou způsobit první příznaky, jako jsou podráždění nosní sliznice, chrapot, kýchání, kašel a bolest v krku. Následuje slzení, výtok z nosu, ztráta čichu i chuti, dušnost a při vysokých koncentracích dochází i ke ztrátě hlasu. S rostoucími dávkami dochází také k tvorbě pseudomembrán podobajícím se těm, které jsou typické pro záškrť. Tyto pseudomembrány se mohou uvolnit z bronchiotracheální stěny a způsobit obstrukci dýchacích cest. Nejfatálnějším důsledkem obstrukce může být zástava srdce. Zvyšující se zánět dýchacích cest a nekróza epitelu působí hemoptýzu a produkci viskózního hlenu obsahujícího nekrotické zbytky. Tento stav může vést k plicní gangréně nebo k těžké plicní infekci (Ghabili et al. 2010, Jošt et al. 2018, Kehe a Szinicz 2005,

Kehe et al. 2008, Wattana a Bey 2009). Často se jedná o pseudomonádové infekce rozvíjející se 36–48 hodin po vystavení způsobující bronchopneumonii, jež má tendenci tvořit abscesy. Tyto obtíže končí fatálně (Wattana a Bey 2009). Mezi další akutní příznaky patří tachypnoe, jež vede k respirační alkalóze. Při nadměrném poškození plicních buněk, ztrátě surfaktantu a rozvoji plicního edému dochází naopak k syndromu akutní dechové tísně a k rozvoji acidózy (Ghabili et al. 2010).

Zlepšení zdravotního stavu nastává obvykle 3. až 4. den od expozice, nicméně úplné vyléčení může trvat 1–2 měsíce (Kassa et al. 1992, Wattana a Bey 2009).

3.8.4 Systémová toxicita

Mezi systémy, které bývají často postiženy působením yperitu, patří kostní dřev, gastrointestinální trakt a centrální nervová soustava. Vysoké dávky mají těž toxické účinky na ledviny a kardiovaskulární systém (Patočka et al. 2004, Wattana a Bey 2009).

Kostní dřev

Yperit může silně poškodit orgány obsahující rychle se dělicí buňky. V případě kostní dřev dochází k myelosupresi, jež je spojena se změnami v krevním obraze a poruchami imunitního systému (Jošt et al. 2018). Na účinek yperitu jsou velmi senzitivní granulocyty a megakaryocyty. U zasaženého se do 3 dnů po expozici může objevit leukocytóza, která je během 7–10 dní následována leukopenií a někdy i pancytopenií. Leukopenie je závažná, počet bílých krvinek bývá okolo 200/ μ l, ale může jich být i méně (McManus a Huebner 2005, Pita a Vidal-Asensi 2010).

Gastrointestinální trakt

Sliznice gastrointestinálního traktu je velmi citlivá na účinky yperitu. Důvodem není pouze lokální účinek při perorální otravě, ale i systémová toxicita po inhalaci nebo po vstřebání kůží (Pita a Vidal-Asensi 2010). Mezi nejběžnější příznaky patří nevolnost, zvracení, anorexie, bolest břicha a průjem. Přechodná nevolnost a zvracení, objevující se v prvních 24 hodinách po expozici, nicméně neznamenají nutně poškození gastrointestinální sliznice. Její poškození společně s vylučováním částí epitelu začíná během několika dní po otravě. Následkem je ztráta velkých objemů tekutin a elektrolytů, zvýšená permeabilita střevní stěny pro toxické látky či snížení lokálního obranného mechanismu před bakteriemi. U zasažených se vyskytovaly nálezy jako akutní gastroduodenitida s hemoragickou erozí, akutní deskvamativní enteritida

a těžká hemoragická nekrotická kolitida (Balali-Mood a Hefazi 2006, Graef a Karnofsky 1948).

Centrální nervová soustava

Doposud nebyl zcela popsán mechanismus, jakým yperit poškozuje centrální nervovou soustavu (Jošt et al. 2018). Byly odhaleny mírné a velmi nespecifické neurologické příznaky, jako jsou bolest hlavy, úzkost, strach z budoucnosti, neklid, zmatenost a letargie (Balali-Mood a Hefazi 2005). Inhalace vysokých koncentrací yperitu může vést k záchvatům, po nichž následuje depresivní fáze, ve které je pacient apatický (Pita a Vidal-Asensi 2010). Ve velmi závažných případech může dojít až k excitaci centrální nervové soustavy spojené s těžkými křečemi (Dacre a Goldman 1996).

3.9 První pomoc a terapie

Terapie otravy yperitem zahrnuje léčbu antidoty, odmoření a specifickou léčbu týkající se konkrétních orgánů. Dále lze zmínit i léčbu antioxidanty, která je momentálně předmětem mnoha výzkumů. Činnosti související s první pomocí jsou uvedeny v následujících bodech.

3.9.1 Zásady první pomoci

Zasažení yperitem musí být rychle přesunutí ze zamořeného prostředí vhodně chráněnými osobami. Veškeré kontaminované oblečení musí být svléknuto, aby yperit nemohl pronikat kůží do těla. Pokožku je třeba důkladně omýt vodou a mýdlem s pH kolem 7,0 nebo jiným šetrným čisticím prostředkem. Je-li množství vody omezené, je možné použít mouku nebo mastek. Tyto látky jsou schopné na sebe yperit z pokožky navázat. V dalším kroku je nutné je setřít, například vlhkým ručníkem. K mytí postižených oblastí je možné také použít olej, petrolej nebo benzín. Dojde-li k zasažení očí, musí být okamžitě vypláchnuty velkým množstvím fyziologického roztoku, Ringerova roztoku nebo vody. Následuje předání zasažených osob do lékařské péče. Lékaři u těchto osob musí stanovit závažnost otravy. Těžce i středně těžce intoxikovaní zůstávají v nemocnici. Lehce zasažení, kteří nemají žádné příznaky, musí být po dobu nejméně 24 hodin sledováni, a pokud se během této doby objeví známky otravy, musí zůstat v péči lékařů. Naopak asymptomaticí pacienti mohou být propuštěni (Bajgar et al. 1991, Balali-Mood a Hefazi 2005, Borak a Sidell 1992, Kassa et al. 1992).

3.9.2 Antidotální léčba

Toxickým projevům yperitu můžeme zabránit podáním infuze thiosíranu sodného v dávce 500 mg/kg. Nicméně k jejímu podání musí dojít bezprostředně po expozici nebo nejpozději do 30 min, tedy dříve, než dojde k tvorbě ireverzibilních vazeb na DNA. Na lokální poškození toto antidotum účinek nemá. Kombinací s řadou dalších látek je možné účinnost thiosíranu sodného zlepšit. Do kombinace lze použít cystein, citrát sodný, dexamethason, promethazin, heparin či vitamín E. Doposud však nebylo vyvinuto žádné specifické antidotum, které by bylo účinné a zároveň by se dalo podat po delší době. (Balali-Mood a Balali-Mood 2009, Balali-Mood a Hefazi 2005, Patočka et al. 2004, Prymula et al. 2002).

3.9.3 Dekontaminace a terapie

3.9.3.1 Gastrointestinální trakt

V případě otravy zažívacího traktu je vhodné vypláchnout ústa následujícími roztoky: 1–2% NaHCO₃, 0,25–0,5% monochloramin B nebo 0,9% NaCl. Lze použít i nezávadnou vodu. Nejpozději do jedné hodiny po podání je nezbytné u postižených vyvolat zvracení nebo odsát žaludeční obsah. Poté opakovaně vypláchnout žaludek 1% roztokem thiosíranu sodného nebo 0,05% roztokem KMnO₄, a to v množství nejvýše 500 ml. Pokud by došlo k výplachu později, je zde vysoké riziko perforace trávicí trubice. Následně podáme postiženému aktivní uhlí v dávce 40 g každé čtyři hodiny. Pro lepší účinek je vhodné jej rozdrtit (Patočka et al. 2004, Prymula et al. 2002).

3.9.3.2 Kožní léze

K odmoření kůže lze použít univerzální prostředek IPB-80 (Desprach). Dále lze použít 1–2% roztok monochloraminu B, 0,5–1% roztok KMnO₄, chlorové vápno či vodné roztoky sirníku sodného, NaHCO₃ a NaClO. Aby bylo zabráněno sekundárním infekcím, musí se postižená místa často mazat antibiotickými krémy obsahujícími stříbrné soli sulfadiazinu (u nás například Ialugen plus) nebo tetracyklinovou mastí. Je možné i podání širokospektrých tetracyklinových antibiotik, např. tetracyklinu nebo oxytetracyklinu. Ke snížení svědění, podráždění či k potlačení zánětlivých reakcí lze použít kortikoidy, systémová antihistaminika nebo suspenzi oxidu zinečnatého. Silná analgetika (např. Dolsin) mohou pomoci s intenzivní bolestí.

Puchýře menší než 2 cm by měly zůstat neporušené. Pokud ovšem dojde k jejich spontánnímu prasknutí, může to hojení urychlit. Puchýře nad 2 cm musí být naopak perforovány a jejich tekutina odsáta. Následuje výplach fyziologickým roztokem a ošetření antimikrobiálními krémy s obsahem stříbrné soli sulfadiazinu nebo mafenid acetátu. U velkých popálenin je vhodné provést transplantaci postižené kůže.

Léčba chronických potíží je převážně symptomatická. Antihistaminika a látky změkčující kůži mohou pomoci se zmírněním svědění a zlepšit suchost pokožky. Hyperpigmentovaná kůže může být ošetřena opalovacími krémy nebo jinými vhodnými krémy (Balali-Mood a Hefazi 2005, Jošt et al. 2018, Patočka et al. 2004, Prymula et al. 2002).

3.9.3.3 Oční léze

Oči je nutné vypláchnout co nejdříve, a to i u asymptomatických pacientů. Vhodnými roztoky k výplachu jsou NaHCO_3 (1–3%), monochloramin B (0,5%) a NaCl (0,9%). Případně lze použít čistou, nezávadnou vodu. Dalšími možnostmi jsou nasycené roztoky síranu sodného, síranu hořečnatého, kyseliny zinečnaté nebo kyseliny borité. Po expozici se může na spálená oční víčka nanést vazelína, aby se zabránilo jejich přilepení.

Mydriatika, například atropin, jsou podávána, aby se předešlo vzniku zadních synechií. Mohou být také použita k utišení bolestí, které jsou vyvolány křečí ciliárního svalu. Ke zmírnění bolesti může být lokálně podán 1–2% kokain. Naopak podání lokálních anestetik je nevhodné, neboť jsou nebezpečná jak pro zdravou, tak i pro poškozenou rohovku.

Lokální kortikoidy lze použít ke snížení otoku spojivky a rohovky, a to pouze pokud nedošlo k epiteliálnímu poškození rohovky. V případě, že k tomuto poškození došlo, je možné je použít až po zhojení. Edém očních víček můžeme tlumit obklady s 2% chloridem vápenatým. Lze je přikládat i 10x za den.

Zánět rohovky můžeme podle závažnosti léčit s použitím umělých slz, terapeutických kontaktních čoček a imunosupresivních léčiv, jako je azathioprin. Možné je i použití lokálních či systémových kortikosteroidů. Příkladem může být hydrokortizon ve formě očních kapek nebo alkalické masti (Balali-Mood a Hefazi 2005, Borak a Sidell 1992, Patočka et al. 2004, Prymula et al. 2002).

3.9.3.4 Respirační systém

Mezi hlavní způsoby léčby patří respirační fyzioterapie, oxygenoterapie a napojení na umělou plicní ventilaci. U pacientů s dýchacími obtížemi je vhodná inhalace vlhkého vzduchu či 2% roztoku NaHCO₃. V závislosti na druhu kašle můžeme podat antitusika nebo expektorancia, jako je N-acetylcystein. Důležité je okamžité podání velkých dávek inhalačního kortikosteroidu beklometasonu, aby se zabránilo vzniku edému plic. Doporučeno je pět hlubokých vdechů každých deset min. U pacientů s hypersenzitivními dýchacími cestami se podávají bronchodilatancia. Jako nejúčinnější se ukázala být kombinace β -agonisty (např. salbutamolu) s anticholinergní látkou (např. ipratropiem). Chemická pneumonitida, která vzniká při velmi vážném poškození dýchacích cest, vyžaduje intenzivní a cílenou léčbu (Balali-Mood a Hefazi 2005, Borak a Sidell 1992, Patočka et al. 2004).

3.9.4 Antioxidační léčba

Ke zmírnění a léčbě poranění, případně ke zlepšení následků způsobených yperitem, lze použít antioxidanty nebo je možné stimulovat jejich zvýšenou intracelulární produkci (Nourani et al. 2016). Nedávné studie ukázaly, že antioxidační terapie našla uplatnění při léčbě zánětu a poškození dýchacích cest (Tahmasbpour et al. 2015).

Antioxidanty snižují oxidační poškození, a to snížením tvorby volných radikálů, reakcí s nimi nebo jejich neutralizací. Například kurkuminoid, N-acetylcystein, GSH, vitamín E, vitamín D, extrakty z Aloe vera a melatonin, snižují markery oxidačního poškození vyvolaného yperitem (Nourani et al. 2016, Tahmasbpour et al. 2015).

Novější studie uvádějí, že perorální podávání samotného kurkuminoidu nebo v kombinaci s piperinem snižuje poškození plic, stimuluje antioxidační aktivitu a potlačuje oxidační stres (Tahmasbpour et al. 2015).

4 HYPOTÉZA

Klinický stav zasažených jedinců společně s *in vivo* experimenty ukazuje, že po perkutánní intoxikaci yperitem dochází k významné absorpci této látky a k poškození různých vnitřních orgánů. Dosavadní studie, hodnotící histopatologické změny po expozici yperitu, se zaměřovaly pouze na účinek konkrétní dávky. Vijayaraghavan et al. (2005) například zkoumali závažnost toxických účinků yperitu v játrech a plicích po perkutánním, subkutánním a perorálním podání 100 % LD₅₀ u myši kmene Swiss albino a u potkanů kmene Wistar. Prokázali, že perkutánní podání yperitu vyvolá vyšší váhový úbytek a závažnější histopatologické změny oproti subkutánnímu a orálnímu podání. Játra se přitom jeví jako nejzávažněji postižený orgán, a to nezávisle na způsobu expozice. Zároveň se jednalo o první studii, která prokázala vyšší toxicitu yperitu po perkutánním než subkutánním podání. Sharma et al. (2008) se naopak zaměřili na porovnání histopatologických změn vyvolaných sirným nebo dusíkatými (HN1, HN2 a HN3) typy yperitů po perkutánní intoxikaci 100 % LD₅₀. Histopatologické vyšetření prokázalo vysokou toxicitu u obou z nich, vyšší toxicitu ze stran jaterní tkáně a ledvin nicméně vykazoval sirný yperit.

Studie hodnotící vztah oxidačního stresu k intoxikaci yperitem *in vivo* jsou čtenější. Většina studií se ale zaměřuje na krátké časové intervaly (≤ 24 h) (Anderson et al. 2000, Pohanka et al. 2011a, Pohanka et al. 2011b, Sauvaigo et al. 2016, Zhang et al. 2019). Výjimkou je například studie Kumara et al. (2001), která hodnotila ukazatele oxidačního stresu v krvi, játrech a plicích u myši kmene Swiss albino tři dny po intoxikaci. Nebo studie Sharma et al. (2009) hodnotící vliv velmi nízkých dávek yperitu ($\leq 1/20$ LD₅₀) při dlouhodobé expozici (12 týdnů) na ukazatele oxidačního stresu v mozku myši stejného kmene. V těchto studiích jsou ale často používány pouze jednotlivé dávky a ve většině případů nejsou změny ukazatelů oxidačního stresu hodnoceny v kontextu histopatologických změn.

Studie, která by hodnotila dávkové a časové závislosti působení yperitu z pohledu rozvoje histopatologických změn vnitřních orgánů v kontextu ukazatelů oxidačního stresu tak doposud chybí. Taková studie by mohla významně přispět k pochopení patogeneze poškození vnitřních orgánů po perkutánní expozici yperitu a přispět svými poznatky ke zlepšení farmakoterapie.

5 CÍLE PRÁCE

Cíle experimentální části diplomové práce je možné rozdělit do dvou skupin:

- A. zhodnotit ukazatele oxidačního stresu *in vivo* prostřednictvím metody TBARS a FRAP v myších játrech, plicích a ledvinách po perkutánní intoxikaci yperitem dávkami odpovídajícími 25 %, 50 %, 75 %, 100 % a 150 % LD₅₀ v intervalu tří, pěti a sedmi dnů,
- B. vyhodnotit histopatologické změny v myších játrech, plicích a ledvinách vyvolané yperitem v dávkách odpovídajících 25 %, 50 %, 75 %, 100 % a 150 % LD₅₀ v intervalu tří, pěti a sedmi dnů.

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Materiál a metodika

6.1.1 Chemikálie

Sírný yperit – byl poskytnut Vojenským technickým ústavem v Brně (Česká republika) a bylo s ním zacházeno pouze v prostorách Katedry toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany (FVZ UO; Hradec Králové, Česká republika) na základě povolení Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (Praha, Česká republika). S yperitem pracovali výhradně proškolení zaměstnanci FVZ UO. Čistota yperitu byla ověřena pomocí 7000D Triple Quadrupole GC-MS (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) a její hodnota byla mezi 97–98 %.

Deionizovaná voda – byla připravena na Katedře toxikologie, FVZ UO pomocí přístroje Aqual 29 (Aqual; Brno, Česká republika).

Ostatní použité chemikálie:

- 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazin (TPTZ) [$\geq 98\%$ (w/w); Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA]
- Aceton (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- Bezvodé montovací médium DPX (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) [$\geq 99,9\%$ (w/w); Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA]
- Eosin (Merck; Praha, Česká republika)
- Ethylalkohol [95% (w/w); Dr. Kulich Pharma, s.r.o.; Hradec Králové, Česká republika]
- Ethylenglykol (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- Fosfátový pufr (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- Fyziologický roztok (B Braun Melsungen AG; Melsungen, Německo)
- HCl [37% (w/w); Penta Chemicals; Chrudim, Česká republika]
- Hematoxylin (Merck; Praha, Česká republika)
- Chloramin T (Alter; Hradec Králové, Česká republika)
- Chlorid železitý bezvodý (FeCl_3) [97 % (w/w); Penta Chemicals; Chrudim, Česká republika]

- Isofluran (Baxter; Deerfield, IL, USA)
- Jodičnan draselný (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- Ledová kyselina octová (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- Neutrální formalín (Chemapol; Praha, Česká republika)
- Parafín (Paramix; Holice, Česká republika)
- Síran hlinitý (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- Tekutý dusík (SIAD; Hradec Králové, Česká republika)
- Thiobarbiturová kyselina (TBA) [$\geq 98,0\%$ (w/w); Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA]
- Trichloroctová kyselina (TCA) [$\geq 99,0\%$ (w/w); Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA]
- Xylen (Lach-Ner; Neratovice, Česká republika)
- Želatina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)

6.1.2 Pomůcky a přístroje

Spotřební materiál:

- Kryozkumavky (TPP Techno Plastic Products AG; Trasadingen, Švýcarsko)
- Kyvety (Verkon; Praha, Česká republika)
- Špičky na pipety (Verkon; Praha, Česká republika)
- Zkumavky (Eppendorf; Hamburg, Německo)

Laboratorní pomůcky a přístroje:

- Analytické váhy CPA225D-OCE (Sartorius AG; Göttingen, Německo)
- Automatické pipety Transferpette S (Brand GmbH + Co.KG; Wertheim, Německo)
- Blokový termostat MBT 250 (Kleinfeld Labortechnik; Gehrden, Německo)
- Centrifuga Universal 320/R (Hettich; Tuttlingen, Německo)
- CO₂ inkubátor NB-203 (N-Biotek; Bucheon-si, Jižní Korea)
- Hlubokomrazicí box (Sanyo; Osaka, Japonsko)
- Homogenizátor s nerezovým dispergačním nástavcem Ultra-Turrax T 10 basic (IKA; Staufen im Breisgau, Německo).
- Inkubátor Memmert BE 500 (Mettler GmbH + Co.KG; Schwabach, Německo)

- Kádinky (Verkon; Praha, Česká republika)
- Krycí sklíčka (Waldemar Knittel Glasverarbeitungs GmbH; Braunschweig, Německo)
- Mikrotom SM 2000R (Leica, Wetzlar, Německo)
- Odměrné baňky (Verkon; Praha, Česká republika)
- Ploténka VD-1 (BIČELS; Hradec Králové, Česká republika)
- Podložní sklíčka (Waldemar Knittel Glasverarbeitungs GmbH; Braunschweig, Německo)
- Skleněná tyčinka (Verkon; Praha, Česká republika)
- Spektrofotometr Evolution 201 (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA)
- Stříhací strojek Moser 1400 (Wahl GmbH; Unterkirnach, Německo)
- Tkáňový procesor Leica TP1020 (Leica; Wetzlar, Německo)
- Umělohmotná podložka (Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně v Hradci Králové)
- Vortex V-1 plus (Biosan; Riga, Lotyšsko)
- Zdravotnická lepicí páska (Livsane; Praha, Česká republika)

6.1.3 Pokusná zvířata

Pro účely experimentu byly použity samice laboratorních myši kmene C57BL/6 (Velaz s.r.o., Únětice, Česká republika). Jejich stáří bylo v rozmezí 12 až 16 týdnů a hmotnost mezi 16 až 24 g. Samice během experimentu přebývaly v klimatizované místnosti o teplotě 22 ± 2 °C a vlhkosti 50 ± 10 % s 12hodinovým světlem (07:00–19:00). Myši byly krmeny dietou DOS-2B (BIOPO spol. s.r.o., Brno, Česká republika) a měly volný přístup k pitné vodě z napáječky. Před experimentem byly myši aklimatizovány ve viváriu po dobu minimálně 15 dnů. Experiment byl prováděn po schválení Etickou komisí FVZ UO (č. j. 69233/2015-MZE-17214). Experimenty se zvířaty prováděli pouze zaměstnanci akreditovaní pro tuto činnost.

6.1.4 Experimentální modely

6.1.4.1 Experimentální model 1

Sedmdesát myši bylo náhodně rozděleno do sedmi skupin po deseti zvířatech, přičemž jedna ze skupin představovala kontrolní skupinu. Dva dny před zahájením

experimentů byly myši končetinami fixovány na umělohmotnou podložku pomocí zdravotnické lepicí pásky. Poté jim byla opatrně vyholena srst v celém rozsahu zad pomocí stříhacího strojku bez nástavce. Následně byla zvířata odpoutána, navrácena do klecí a pokožka zad ponechána regenerovat po zákroku.

Po uplynutí dvoudenního intervalu byla zvířata opět fixována na umělohmotnou podložku (postup viz výše) a umístěna do digestoře určené pro práci s BCHL a laboratorními zvířaty. Do střední části zad (mezi lopatky horních končetin) byl jednotlivým skupinám perkutánně aplikován yperit v dávkách 75, 100, 125, 150, 175 a 200 mg/kg. Yperit byl ponechán působit po dobu 60 min. Poté byla pokožka zad dekontaminována pomocí 2% roztoku chloraminu T, zvířata byla odfixována a navrácena do klecí. Po dobu 30 dnů bylo sledováno přežívání zvířat. Na základě tohoto experimentu byla vypočítána $LD_{50/30}$ pro další experiment. Myši v kontrolní skupině podstoupily stejnou proceduru, ale místo yperitu jim byl aplikován fyziologický roztok.

6.1.4.2 Experimentální model 2

V tomto experimentu byly myši rozděleny do 17 skupin dle následující tabulky (tab. 3), včetně třech kontrolních a 14 intoxikovaných skupin. Kontrolní i intoxikované skupiny prošly stejnou procedurou (odstranění srsti dva dny před experimentem, aplikace yperitu a následná dekontaminace) jako myši v předchozím experimentálním modelu (viz kapitola 6.1.4.1). Kontrolním myším byl však místo yperitu na pokožku zad aplikován fyziologický roztok. Po dobu tří, pěti a sedmi dnů bylo pozorováno přežívání zvířat a vliv LD_{50} na změny jejich váhy.

Tab. 3 Přehled skupin laboratorních myší perkutánně intoxikovaných yperitem.

Dávka yperitu	Celkový počet myší	Den odběru		
		3. den	5. den	7. den
<i>kontroly</i>	21	7	7	7
<i>25% LD₅₀</i>	21	7	7	7
<i>50% LD₅₀</i>	21	7	7	7
<i>75% LD₅₀</i>	22	7	7	8
<i>100% LD₅₀</i>	31	7	12	12
<i>150% LD₅₀</i>	18	6	12	–

Počty zvířat byly 5. a 7. den ve skupinách intoxikovaných 75 %–150 % LD₅₀ yperitu navýšeny kvůli možnému úhynu. Skupina intoxikovaná 150 % LD₅₀, která byla odebírána 7. den po intoxikaci, nebyla na základě předchozích výsledků do tohoto experimentu zařazena.

Třetí, pátý a sedmý den po intoxikaci došlo k odběru biologických vzorků. Myši byly nejdříve usmrceny za použití anestézie isofluranu. Po provedení euthanasie byly pro další vyšetření odebrány vzorky plic, jater a ledvin.

Vzorky určené pro stanovení parametrů oxidačního stresu byly bezprostředně po odběru vloženy do 1,5 ml kryozkumavek a okamžitě vloženy do tekutého dusíku. Následovalo uchování v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C, než byla provedena další analýza. Vzorky určené pro histopatologické vyšetření byly vloženy do nádoby s roztokem 10% neutrálního formalínu.

6.1.5 Homogenizace orgánů pro stanovení oxidačního stresu

Před vlastní homogenizací byly játra, plíce a ledviny nejprve rozmrazeny. Následovalo zvážení jednotlivých orgánů na analytických vahách. Byla-li jejich hmotnost větší než 250 mg, byla z nich skalpelem odebrána část o hmotnosti přibližně 200 mg. Tato část byla umístěna do 10 ml zkumavky. Při hmotnosti menší než 200 mg byl ponechán celý orgán. K orgánu byl následně přidán fosfátový pufr v množství 1 ml na 100 mg vzorku a byla provedena homogenizace pomocí homogenizátoru s nerezovým dispergačním nástavcem. Nejprve 10 až 15 s a poté se zkumavky nechaly stát na ledu po dobu 5 ± 1 min. Bezprostředně po uplynutí tohoto času proběhla další 10s homogenizace. Následovalo odstředění ($3000 \times g$, 5 min, 4 °C) pomocí stolní centrifugy a přepipetování 30 μ l supernatantu do třech 1,5 ml zkumavek a 200 μ l supernatantu do třech 2 ml zkumavek. Takto připravené vzorky byly uchovány pro pozdější použití při -80 °C.

6.1.6 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Nejdříve bylo nutné zkumavky se zhomogenizovanými vzorky orgánů rozmrazit. Během této doby byly připraveny roztoky nutné pro provedení této metody. Prvním byl 10mM roztok TPTZ ve 40mM HCl a druhým 20mM roztok FeCl₃ v deionizované vodě. Posledním roztokem byl 0,1M octanový pufr o pH 3,6. Z těchto roztoků byl následně čerstvě připraven roztok reakční směsi (3 ml TPTZ + 3 ml FeCl₃ +

30 ml octanového pufru), který byl zahříván v CO₂ inkubátoru 10 min na 37 °C. Do 1,5 ml zkumavky bylo k 30 μl vzorku nebo k 30 μl 10mM fosfátového pufru o pH 7,4 (blank) přidáno 200 μl připraveného činidla a vzniklá směs byla zředěna 770μl deionizované vody. Po promíchání na vortexu byly vzorky 10 min inkubovány při laboratorní teplotě. Následovalo vložení zkumavek se směsí do centrifugy (10000x g, 10 min, 4 °C). Vzniklý supernatant byl přepipetován do jednorázové kyvety a na spektrofotometru byla změřena absorbance při vlnové délce 593 nm proti blanku.

Hodnota FRAP byla vypočítána za pomoci extinkčního koeficientu dle následujícího vzorce:

$$c = [(A * \text{\textit{ředění}} * \text{\textit{koef}}) / \epsilon] * 10^6$$

c ... koncentrace antioxidantů ve vzorku [μmol/g]

A ... absorbance testovaného vzorku

ředění FRAP = 33,33

koef ... koeficient pro tkáň = 0,011

ε ... extinkční koeficient FRAP = 26200 l·mol⁻¹·cm⁻¹

6.1.7 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Tato metoda byla také zahájena rozmrazením zhomogenizovaných vzorků a přípravou potřebných roztoků. Prvním z nich byl 10% roztok TCA v deionizované vodě, druhým byl roztok TBA v DMSO. Následně bylo do 2 ml zkumavky s 200 μl rozmrzlého vzorku nebo s 200 μl 10mM fosfátového pufru o pH 7,4 (blank) přidáno 400 μl TCA. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 15 min na ledu. Poté byl roztok odstředěn na centrifuze (3000 × g, 15 min, 4 °C). 400 μl odebraného supernatantu bylo smícháno se 400 μl TBA a směs byla promíchána. Následně byla provedena inkubace vzorku v blokovém termostatu při teplotě 100 °C po dobu 10 min. Poté došlo pod tekoucí vodou k ochlazení na laboratorní teplotu (přibližně 1 min). Ihned po zchlazení byla měřena absorbance při vlnové délce 532 nm proti blanku.

Hodnota TBARS byla vypočítána za pomoci extinkčního koeficientu dle tohoto vzorce:

$$c = [(A * \text{\textit{ředění}} * \text{\textit{koef}}) / \epsilon] * 10^9$$

c ... koncentrace MDA ve vzorku [nmol/g]

A ... absorbance testovaného vzorku

ředění TBARS = 6

koef ... koeficient pro tkáň = 0,011

ε ... extinkční koeficient TBARS = $156000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

6.1.8 Zhotovení histologických preparátů

Zafixování, dehydratace a zalití preparátů do parafínu

Odebrané vzorky byly v roztoku formalínu fixovány po dobu minimálně sedmi dnů, než bylo přistoupeno k jejich dalšímu zpracování. To spočívalo nejprve v opláchnutí vzorků pod tekoucí vodou po dobu 60 min. Po vypláchnutí následovalo vložení do vzestupné alkoholové řady, xyleny a parafínu. Celý proces dehydratace proběhl ve tkáňovém procesoru a její průběh je stručně popsán v tab. 4. Posledním krokem bylo zalití vzorků do parafínových bločků.

Tab. 4 Průběh dehydratace v tkáňovém procesoru

Pořadí	Typ lázně	Délka lázně
1.	ethylalkohol 70%	60 min
2.	ethylalkohol 70%	60 min
3.	ethylalkohol 80%	120 min
4.	ethylalkohol 90%	60 min
5.	ethylalkohol 95%	60 min
6.	ethylalkohol 95%	90 min
7.	ethylalkohol 99%	180 min
8.	xylén	90 min
9.	xylén	90 min
10.	xylén	90 min
11.	parafín	240 min
12.	parafín	300 min

Nakrájení a natažení preparátů na podložní sklíčka

Po zatuhnutí parafínu byly z parafínových bločků ukrojeny pomocí mikrotomu celkem tři řezy o šířce 5 μm . Vzniklé řezy byly dány na podložní mikroskopická sklíčka, která byla předem zbavena mastnoty za použití 70% ethylalkoholu a byl na ně nanesen roztok 0,5% želatiny. Pro natažení řezů je důležité, aby byla podložní sklíčka položena na ploténku o teplotě 37–40 °C. Přebytkovou želatinu bylo nutné slít a nechat

okapat. Preparáty byly následně vloženy k dosušení do inkubátoru Memmert BE 500 vyhřátého na teplotu 37 °C.

Odstranění parafinu

Před nabarvením preparátů bylo nezbytné odstranit z řezů, natažených na podložní sklíčko, parafin. K tomuto účelu posloužila lázeň obsahující sestupnou alkoholovou řadu a xylen, do které byla ponořena podložní mikroskopická sklíčka. Přehledně je proces odparafinování popsán v tab. 5.

Tab. 5 Proces odstranění parafinu z preparátů

Pořadí	Typ lázně	Délka lázně
1.	xylen	10 min
2.	xylen	10 min
3.	xylen	10 min
4.	ethylalkohol 96%	10 min
5.	ethylalkohol 96%	10 min
6.	ethylalkohol 70%	10 min
7.	deionizovaná voda	5 min

Barvení hematoxylin-eosinem

Odparafinované mikroskopické preparáty byly nabarveny základním histologickým barvivem hematoxylin-eosinem. V prvním kroku bylo potřebné připravit roztok Gillova hematoxylinu. V 710 ml deionizované vody byly za současného míchání rozpuštěny 4 g hematoxylinu, 0,4 g jodičnanu draselného a 35,2 g síranu hlinitého. K tomuto roztoku bylo za nepřetržitého míchání přidáno 250 ml ethylenglykolu. Na závěr byl roztok smíchán se 40 ml ledové kyseliny octové.

Do takto vytvořené směsi byly na 3 min vloženy preparáty, které byly následně omyty deionizovanou vodou a diferencovány v 70% ethylalkoholu a následně v kyselém alkoholu (200 ml 100% ethylalkoholu, 7,5 ml 37% HCl a 900 ml deionizované vody). Výsledkem bylo vybarvení biologických vzorku do modra. V dalším kroku byly preparáty nejprve omyty tekoucí kohoutkovou vodou a pak opláchnuty vodou deionizovanou. Úplný proces diferenciaci hematoxylinu a omývání, včetně délek jednotlivých inkubací, je zobrazen v tab. 6.

Tab. 6 Proces diferenciacie a omývání preparátů

Pořadí	Typ lázně	Délka lázně
1.	ethylalkohol 70%	3–5 s
2.	kyselý alkohol	3–5 s
3.	kohoutková voda	20 min
4.	deionizovaná voda	1 min

V konečné fázi proběhlo obarvení preparátů 1% vodným roztokem eosinu. Následovalo opláchnutí deionizovanou vodou a opakované ponoření do různých typů lázní. Nejprve šlo o lázeň obsahující vzestupnou alkoholovou řadu, následně aceton a nakonec xylen tak, jak je znázorněno v tab. 7.

Tab. 7 Obarvení 1% vodným roztokem eosinu

Pořadí	Typ lázně	Délka lázně
1.	1% vodný roztok eosinu	1 min
2.	deionizovaná voda	opláchnutí
3.	ethylalkohol 70%	2 min
4.	ethylalkohol 80%	2 min
5.	ethylalkohol 96%	2 min
6.	aceton	2 min
7.	xylen	5 min
8.	xylen	5 min
9.	xylen	5 min

Zamontování

Dehydratované a obarvené preparáty byly na závěr zamontovány do bezvodého montovacího média DPX. Toto montovací médium bylo vybráno hlavně pro svůj dobrý index lomu, který je podobný křemičitému sklu (ve zbarvených tkáních nevyvolává barevné změny). Toto médium bylo na řezy nanášeno skleněnou tyčinkou. Na jejich povrch se poté s obezřetností položilo krycí sklíčko. Preparáty byly nakonec vloženy na dosušení do inkubátoru Memmert BE 500 vyhřátého na 37 °C.

6.2 Vyhodnocení preparátů

U zhotovených preparátů jater, plic a ledvin byly histopatologické změny hodnoceny jedním pozorovatelem pomocí mikroskopu BX-51 (Olympus; Tokio, Japonsko).

Histopatologické změny byly posuzovány dle následujících kritérií:

- 0 – žádný nález
- 1 – ojedinělé změny (<12 %)
- 2 – mírné změny (<22 %)
- 3 – středně závažné změny (<45 %)
- 4 – závažné změny (>45 %)

V jaterní tkáni byla navíc hodnocena extramedulární hematopoéza. Tento parametr představoval počet ostrůvků hematopoetické tkáně na zorné pole při 200násobném zvětšení. Za ostrůvek hematopoetické tkáně byl považován shluk ≥ 5 buněk erytroidní nebo granulocytární/monocytární řady nebo ≥ 1 buněk megakaryocytické řady.

U plic byla navíc hodnocena i vzdušnost plicní tkáně prostřednictvím počítačové analýzy obrazu. Za tímto účelem byly nejprve pořízeny mikroskopické snímky pomocí kamery DP-71 (Olympus; Tokio, Japonsko) a softwaru CellSens Entry (Olympus; Tokio, Japonsko). Z každého vzorku bylo pořízeno 10 snímků při 400násobném zvětšení. Prostřednictvím softwaru ImagePro 5.1 (Media Cybernetics Inc.; Rockville, MD, USA) byla poté hodnocena vzdušnost plicní tkáně, která byla vyjádřena jako procentuální velikost bílé plochy v neinvertovaném RGB spektru v rozsahu R 185–255, G 185–255 a B 185–255, kde 0 představuje černou barvu a 255 barvu bílou.

Pomocí stejného systému byly pořízeny i obrázky dokumentující histopatologické změny.

6.3 Prezentace dat a statistická analýza

Data v tabulkách jsou prezentována prostřednictvím mediánů \pm mezikvartilový rozptyl (IQR). Ke stanovení statistické významnosti rozdílu dat byly zjištěné údaje analyzovány pomocí programu IBM SPSS Statistics verze 24 (IBM; Armonk, NY, USA).

Přežívání zvířat v experimentálním modelu 1 bylo analyzováno prostřednictvím Kaplan-Meierova testu. Pro zhodnocení LD₅₀ byla následně použita probitová analýza. Ostatní data byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu s post hoc Mann-Whitneyho testem. Úroveň statistické významnosti byla u obou testů stanovena na hladině $p \leq 0,05$.

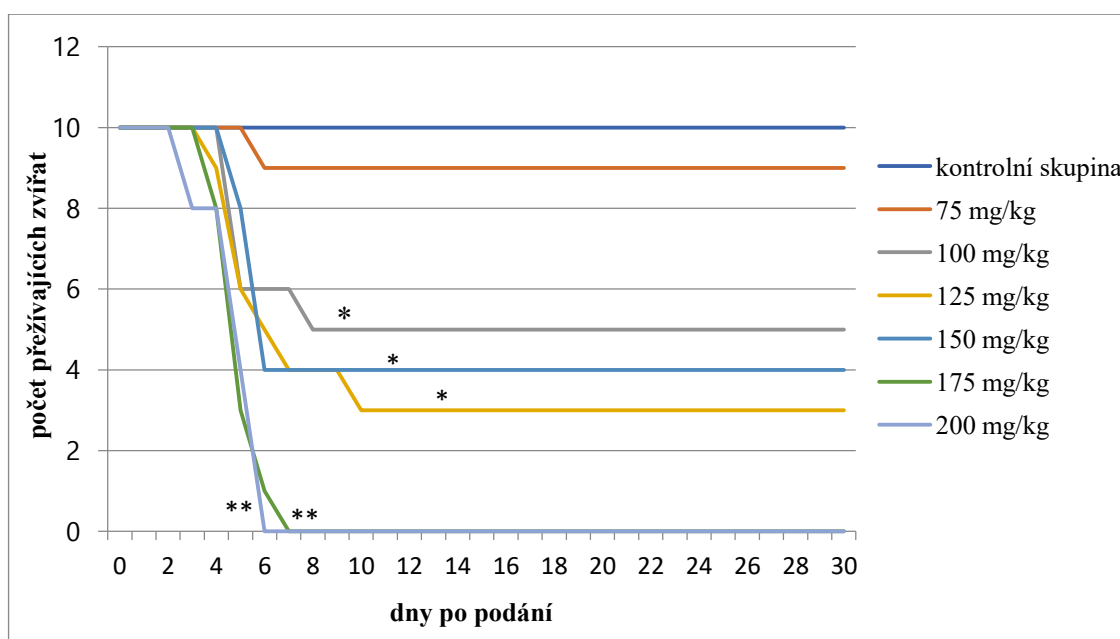
7 VÝSLEDKY

7.1 Experimentální model 1

7.1.1 Přežívání zvířat

Přežívání myši v tomto experimentálním modelu je podrobně znázorněno na obr. 13. V kontrolní skupině přežilo všech deset myši. Dávka 75 mg/kg sice způsobila úmrtí jedné myši během 6. dne, nicméně toto úmrtí není ve srovnání s kontrolní skupinou statisticky signifikantní.

Statisticky významná data nacházíme až u myši, kterým byl yperit aplikován v dávkách 100–200 mg/kg. U zvířat intoxikovaných dávkou 100, 125 a 150 mg/kg došlo k 40%, 70% a 60% úhynu. Poslední dvě dávky (175 a 200 mg/kg) způsobily postupně úhyn všech myši, a to do 7. dne (175 mg/kg) nebo 6. den (200 mg/kg).



Obr. 13 Vliv yperitu podaného v šesti dávkách na přežívání zvířat. Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *, $p < 0,001$ – **.

7.1.2 Stanovení LD₅₀

Díky údajům, které byly získány z přežívání zvířat (viz kapitola 7.1.1) byla pomocí probitové analýzy stanovena LD₅₀. Její hodnota je 109,2 mg/kg. Konfidenční

interval byl nastaven na hodnotu 95 %, jeho dolní a horní hranice se nachází na hodnotách 91,2 a 124,2 mg/kg.

7.2 Experimentální model 2

7.2.1 Přežívání zvířat

U kontrolní skupiny přežilo všech 21 samic. V intoxikovaných skupinách uhynulo před odběrem biologických vzorků 21 myší z celkových 113, viz tab. 8.

Tab. 8 Přežívání myší v experimentálním modelu 2

LD ₅₀ (%)	0	25	50	75	100	150
Počet myší ve skupině	21	21	21	22	31	18
Počet uhynulých myší	0	0	1	1	13	6
Den úmrtí (počet myší)	–	–	5 (1)	5 (1)	4 (1) 5 (10) 6 (1) 7 (1)	2 (2) 5 (4)
Počet myší ve skupině (3. den)	7	7	7	7	7	6
Počet myší ve skupině (5. den)	7	7	6	7	6	6
Počet myší ve skupině (7. den)	7	7	7	7	5	–

0 = kontrolní skupina

Vliv LD₅₀ na změny hmotnosti

Kromě přežívání myší byly sledovány i změny jejich hmotnosti 3., 5. a 7. den od intoxikace. V tab. 9 jsou uvedeny průměrné hodnoty změny jejich váhy v procentech.

Tab. 9 Změna hmotnosti zvířat v experimentálním modelu $2 \pm \text{IQR}$

Hmotnostní změna proti stavu před otravou	LD ₅₀ (%)					
	0	25	50	75	100	150
3. den	0,98 ± 0,03	0,97 ± 0,03	0,98 ± 0,06	0,89 ± 0,06*	0,94 ± 0,03*	0,88 ± 0,03*
5. den	0,97 ± 0,04	1,00 ± 0,03	0,96 ± 0,07	0,97 ± 0,17	0,78 ± 0,05*	0,77 ± 0,02*
7. den	1,00 ± 0,02	1,02 ± 0,03	1,05 ± 0,05*	0,97 ± 0,19*	0,78 ± 0,06*	–

0 = kontrolní skupina

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05 - *$.

Na základě statistické analýzy bylo zjištěno, že signifikantní změna váhy oproti kontrole byla zaznamenána 3. den po intoxikaci u třech skupin. U 75 % LD₅₀ došlo k poklesu váhy o 0,09 g, u 100 % LD₅₀ byl pokles 0,04 g, u 150% LD₅₀ bylo snížení nejvýraznější, a to 0,10 g. Další významný pokles hmotnosti byl zjištěn u samic, které byly váženy 5. den. Jednalo se o myši, kterým byla aplikována 100 % a 150% LD₅₀. Jejich hmotnost se snížila o 0,19 g a 0,2 g ve srovnání s kontrolní skupinou. U myši, které byly váženy 7. den, byl zaznamenán jak signifikantní nárůst hmotnosti, tak její signifikantní pokles. K 0,05 g vzrůstu došlo u skupiny, které byla aplikována poloviční LD₅₀. Naopak k poklesu o 0,03 g došlo u 75 % LD₅₀. U skupiny, které byla podána celá LD₅₀, byl pokles váhy 0,22 g.

7.2.2 Stanovení TBARS

Jedním z výsledných produktů peroxidace lipidů je MDA. Ke zjištění jeho hladiny v játrech, plicích a ledvinách byla použita metoda TBARS. Výsledky měření jsou znázorněny v následujících tabulkách.

Intoxikací yperitem byl v jaterní tkáni významně ovlivněn pouze třídní a pětidenní interval. Tři dny po otravě vykazovala skupina, které byla podána 100 % LD₅₀, 1,5násobný pokles oproti kontrole. U myši, kterým byla podána 150 % LD₅₀, bylo nalezeno 3,0- a 3,9násobné snížení hladin TBARS ve srovnání s hodnotami kontrolních skupin (tab. 10).

Tab. 10 Hodnoty TBARS v játrech po perkutánní intoxikaci yperitem ± IQR

TBARS (nmol/g)	LD ₅₀ (%)					
	0	25	50	75	100	150
3. den	262 ± 37	247 ± 64	274 ± 40	334 ± 113	174 ± 80*	88 ± 49*
5. den	316 ± 85	281 ± 43	297 ± 45	235 ± 66	605 ± 323	82 ± 6*
7. den	134 ± 85	118 ± 96	106 ± 86	103 ± 104	107 ± 11	–

0 = kontrolní skupina

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *.

I když nám Kruskal-Wallisův test poskytl informace, že u tří denního intervalu jsou statisticky signifikantní změny, ve srovnání s kontrolní skupinou nebyl rozdíl v plicní tkáni nalezen. Signifikantní snížení nacházíme až 5. den po intoxikaci při aplikaci dávky vyšší než 75 % LD₅₀. U těchto skupin došlo k 1,5-, 1,7- a 1,6násobnému poklesu hodnot oproti kontrole. V sedmidenním intervalu byl zaznamenán 1,5- a 2,7násobný pokles ve srovnání s kontrolou u 75 % a 100% LD₅₀ (tab. 11).

Tab. 11 Hodnoty TBARS v plicích po perkutánní intoxikaci yperitem ± IQR

TBARS (nmol/g)	LD ₅₀ (%)					
	0	25	50	75	100	150
3. den	238 ± 50	261 ± 59	271 ± 28	160 ± 37	261 ± 40	202 ± 24
5. den	219 ± 48	238 ± 104	245 ± 33	146 ± 19*	128 ± 32*	133 ± 43*
7. den	256 ± 47	223 ± 71	233 ± 34	169 ± 31*	95 ± 22*	–

0 = kontrolní skupina

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *.

Statisticky výrazný pokles hodnot TBARS v ledvinách nacházíme 3. den po intoxikaci 50 %, 75 % a 100 % LD₅₀. Tento pokles byl ve srovnání s hodnotou kontrolní skupiny 5,1-, 8,4- a 5,7násobný. Další statisticky signifikantní

snížení vykazuje pětidenní interval. K 2,8-, 5,2- a 7,1násobnému poklesu došlo u 25 %, 75 % a 150 % LD₅₀. Otrava yperitem způsobila taky významný pokles hodnot 7. den u 75 % a 100 % LD₅₀. Tento pokles byl v porovnání s kontrolou 4,8- a 6,3násobný (tab. 12).

Tab. 12 Hodnoty TBARS v ledvinách po perkutánní intoxikaci yperitem ± IQR

TBARS (nmol/g)	LD ₅₀ (%)					
	0	25	50	75	100	150
3. den	594 ± 88	539 ± 109	117 ± 41*	71 ± 90*	105 ± 33*	117 ± 153
5. den	450 ± 41	164 ± 309*	144 ± 147	87 ± 19*	54 ± 30	63 ± 14*
7. den	366 ± 358	132 ± 120	120 ± 68	76 ± 17*	58 ± 16*	–

0 = kontrolní skupina

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *.

7.2.3 Stanovení FRAP

Pro zjištění celkové koncentrace antioxidantů v odebraných biologických tkáních (játra, plíce a ledviny) posloužila metoda FRAP. Získané výsledky jsou prezentovány v následujících tabulkách.

V jaterní tkáni byl u tří denního intervalu zjištěn signifikantní nárůst hladiny FRAP. Konkrétně se jedná o skupiny, kterým byla podána 25 % a 75 % LD₅₀ yperitu. Toto zvýšení bylo ve srovnání s kontrolní skupinou 1,4- a 1,3násobné. Další statisticky významný nárůst, ale i pokles oproti kontrole je patrný 5. den po otravě. U 25 %, 50 %, 75 %, 100 % a 150 % LD₅₀ bylo měřen 1,5-, 1,3-, 1,3-, 1,4- a 2násobný nárůst hodnot FRAP. Sedmý den po podání yperitu bylo u 25 % a 50 % LD₅₀ nalezeno signifikantní zvýšení jaterních hladin FRAP, a to 1,3- a 1,4násobné v porovnání s kontrolou (tab. 13).

Tab. 13 Hodnoty FRAP v játrech po perkutánní intoxikaci yperitem ± IQR

FRAP ($\mu\text{mol/g}$)	LD ₅₀ (%)					
	0	25	50	75	100	150
3. den	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,1*	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1*	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
5. den	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,3*	0,6 ± 0,1*	1,0 ± 0,0*	1,1 ± 0,3*	1,6 ± 0,5*
7. den	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1*	1,1 ± 0,5*	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,2	–

0 = kontrolní skupina

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *.

Yperit způsobil signifikantní změny hladin FRAP v plicní tkáni ve všech sledovaných intervalech. K 1,1násobnému poklesu došlo 3. den u 25 % LD₅₀, naopak 1,3násobný nárůst v porovnání s kontrolou je patrný u 75 % a 150 % LD₅₀. Statisticky významný nárůst byl zjištěn u stejných dávek 5. den po otravě. Toto zvýšení bylo 1,1- a 1,4násobné. K dalšímu výraznému vzrůstu hladin došlo u 100 % a 150 % LD₅₀. Jednalo se o 1,6- a 1,7násobný nárůst vzhledem k hodnotě kontrolní skupiny. V sedmidenním intervalu vykazovala dávka 50 % LD₅₀ 1,2násobný pokles, zatímco k 1,1násobnému růstu hodnot FRAP došlo po podání 75 % LD₅₀. (tab. 14).

Tab. 14 Hodnoty FRAP v plicích po perkutánní intoxikaci yperitem ± IQR

FRAP ($\mu\text{mol/g}$)	LD ₅₀ (%)					
	0	25	50	75	100	150
3. den	1,9 ± 0,1	1,7 ± 0,2*	2,0 ± 0,2	2,5 ± 0,5*	2,3 ± 0,3	2,5 ± 0,3*
5. den	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,2*	1,9 ± 0,1	2,7 ± 0,3*	3,0 ± 1,2*	3,3 ± 0,8*
7. den	2,2 ± 0,3	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,2*	2,5 ± 0,2*	2,5 ± 0,1	–

0 = kontrolní skupina

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *.

Statisticky významné změny jsou v ledvinách patrné pouze u tří a pětidenního intervalu. U 50 % LD₅₀ došlo k 2,2- a 1,8násobnému zvýšení oproti hodnotám kontrol. Myším, kterým byla podána 75 % LD₅₀, hladina FRAP ve srovnání s kontrolními skupinami vzrostla 2,6- a 2,2násobně. Další signifikantní nárůst byl zjištěn u skupin, kterým byla podána 100 % LD₅₀. Hodnoty jsou vzhledem ke kontrolám zvýšené 2,0- a 2,2násobně. U 150 % LD₅₀ byl nárůst pozorovaný pouze v pětidenním intervalu a zaznamenal 1,5násobný vzestup v porovnání s kontrolní skupinou (tab. 15).

Tab. 15 Hodnoty FRAP v ledvinách po perkutánní intoxikaci yperitem ± IQR

FRAP ($\mu\text{mol/g}$)	LD ₅₀ (%)					
	0	25	50	75	100	150
3. den	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1*	1,3 ± 0,1*	1,0 ± 0,1*	0,7 ± 0,1
5. den	0,6 ± 0,0	1,3 ± 0,7	1,1 ± 0,1*	1,3 ± 0,1*	1,3 ± 0,3*	0,9 ± 0,2*
7. den	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	–

0 = kontrolní skupina

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *.

7.2.4 Histopatologické vyšetření jater

Ve srovnání s kontrolní skupinou (viz příloha 1) byly v třídením intervalu signifikantní změny v histopatologickém obraze jaterní tkáně nalezeny pouze ve skupině intoxikované 100 a 150 % LD₅₀. U šesti ze sedmi myší a u pěti ze šesti myší zde došlo k mírnému nárůstu apoptotické aktivity (příloha 2; tab. 16).

Tab. 16 Histopatologické nálezy v jaterním parenchymu 3. den od intoxikace

LD ₅₀ (%)	3. den					
	0	25	50	75	100	150
<i>Atrofie</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Degenerativní změny buněk</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Apoptóza/nekróza</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0,5	1 ± 1*	1 ± 1*
<i>Mitotická aktivita</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Krvácení</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Zánětlivá infiltrace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny cév</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny žluč. cest</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny mesotelia</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

0 = kontrolní skupina

Semikvantitativní skóre: 0 – žádný nález, 1 – ojedinělé změny (<12 %), 2 – mírné změny (<22 %), 3 – středně závažné změny (<45 %), 4 – závažné změny (> 45 %).

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *

V pětidenním intervalu byly patrné signifikantní změny ve skupině intoxikované 100 % LD₅₀, ve které byly u všech zvířat v ojedinělém až mírném rozsahu patrné degenerativní změny v podobě mikrovesikulární degenerace (příloha 3). U čtyřech ze šesti zvířat byly rovněž patrné známky atrofie hepatocytů postihující zejména buňky v oblasti centrální žíly jaterních acinů, tento nález nicméně nebyl statisticky významný. Signifikantní atrofie byla pozorována ve skupině otrávené 150 % LD₅₀ (příloha 4). V této skupině byly patrné i ojedinělé mikro- až mediovesikulární změny a vyšší apoptotická aktivita, pouze však nesignifikantně u dvou a třech ze šesti myší (tab. 17).

Tab. 17 Histopatologické nálezy v jaterním parenchymu 5. den od intoxikace

LD ₅₀ (%)	5. den					
	0	25	50	75	100	150
<i>Atrofie</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,5 ± 1,8	2 ± 1,5*
<i>Degenerativní změny buněk</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2,5 ± 2,5*	1,5 ± 1,8
<i>Apoptóza/nekróza</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 1
<i>Mitotická aktivita</i>	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0,8	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
<i>Krvácení</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Zánětlivá infiltrace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny cév</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny žluč. cest</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny mesotelia</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

0 = kontrolní skupina

Semikvantitativní skóre: 0 – žádný nález, 1 – ojedinělé změny (<12 %), 2 – mírné změny (<22 %), 3 – středně závažné změny (<45 %), 4 – závažné změny (> 45 %).

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *

U sedmidenního intervalu byly nalezeny statisticky významné změny v porovnání s kontrolou pouze u skupin intoxikovaných 75 % a 100 % LD₅₀. V prvním případě došlo k nárůstu apoptózy. Nesignifikantně tento nález doprovázely ojedinělé atrofické změny (u dvou ze sedmi zvířat), těžké mikro- až mediovesikulární změny (jedno ze sedmi zvířat) a ojedinělá zánětlivá infiltrace (čtyři ze sedmi zvířat). Při vyšší dávce se ke zvýšené apoptotické aktivitě přidaly také mírné až středně těžké atrofické změny (s pericentrální dominancí) a zvýšená granulocytární infiltrace (příloha 5). Rovněž zde byly patrné nesignifikantní známky regenerace (u dvou z pěti myší) (tab. 18).

Tab. 18 Histopatologické nálezy v jaterním parenchymu 7. den od intoxikace

LD ₅₀ (%)	7. den				
	0	25	50	75	100
<i>Atrofie</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0,5	1 ± 3*
<i>Degenerativní změny buněk</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Apoptóza/nekróza</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0,5*	1 ± 0*
<i>Mitotická aktivita</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1
<i>Krvácení</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Zánětlivá infiltrace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 1*
<i>Patologické změny cév</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny žluč. cest</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny mesotelia</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

0 = kontrolní skupina

Semikvantitativní skóre: 0 – žádný nález, 1 – ojedinělé změny (<12 %), 2 – mírné změny (<22 %), 3 – středně závažné změny (<45 %), 4 – závažné změny (> 45 %).

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *

V jaterní tkáni byla navíc hodnocena hematopoéza. Ke staticky signifikantnímu snížení hematopoézy ve srovnání s kontrolou došlo v třídením a pětidením intervalu. V třídením intervalu klesl medián k nulovým hodnotám po intoxikaci 75 %–150 % LD₅₀, zatímco v pětidením intervalu byly tyto změny patrné pouze po otravě dávkami odpovídajícími 100 % a 150 % LD₅₀. V sedmidenním intervalu bylo naopak patrné kompenzační zvýšení extramedulární hematopoetické aktivity při expozici 50 % (příloha 6) a 75 % LD₅₀, u kterých došlo k 12,5- a 13,5násobnému zvýšení mediánu hodnot (tab. 19).

Tab. 19 Počet ostrůvků hematopoetických buněk na zorné pole při 200x zvětšení

	LD ₅₀ (%)					
	0	25	50	75	100	150
3. den	0,3 ± 0,4	0,5 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,0 ± 0,1*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*
5. den	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,5 ± 1,0	0,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*
7. den	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,3	2,5 ± 6*	2,7 ± 2,9*	0,3 ± 0,5	–

0 = kontrolní skupina

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *.

7.2.5 Histopatologické vyšetření plic

Histopatologické změny měřené v plicích v třídním intervalu jsou znázorněny v tab. 20. Statisticky signifikantní změny v porovnání s kontrolními skupinami byly nalezeny u třech nejvyšších dávek. U všech myší, kterým byl yperit aplikován ve formě 75 %, 100 % a 150 % LD₅₀, byl zjištěn významný intersticiální otok a zvýšená hyperémie. V případě nevyšší dávky bylo možné ojediněle pozorovat i intraalveolární otok.

Tab. 20 Histopatologické nálezy v plicní tkáni 3. den od intoxikace

LD ₅₀ (%)	3. den					
	0	25	50	75	100	150
<i>Degenerativní změny buněk</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Nekróza/deskvamace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Mitotická aktivita</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Intersticiální otok</i>	0 ± 1	2 ± 1,5	1,5 ± 1	3 ± 2,5*	2 ± 2*	2 ± 0*
<i>Intraalveolární otok</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0,5	0 ± 1	1 ± 1	1 ± 0*
<i>Hyperémie</i>	0 ± 0	1 ± 1,5	1 ± 1	2 ± 0*	2 ± 0,5*	2 ± 0*
<i>Krvácení</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Zánětlivá infiltrace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny cév</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

<i>Patologické změny dýchacích cest</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
-----------------------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

0 = kontrolní skupina

Semikvantitativní skóre: 0 – žádný nález, 1 – ojedinělé změny (<12 %), 2 – mírné změny (<22 %), 3 – středně závažné změny (<45 %), 4 – závažné změny (> 45 %).

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *

V pětidenním intervalu nacházíme statisticky významná data ve srovnání s kontrolou u všech intoxikovaných skupin. Při dávkách 25 %–150 % LD₅₀ byl patrný významný intersticiální otok a zvýšená hyperémie. U dávek 50 %, 100 % a 150 % LD₅₀ se k tomuto nálezu ojediněle přidal i intraalveolární edém (tab. 21).

Tab. 21 Histopatologické nálezy v plicní tkáni 5. den od intoxikace

5. den						
LD ₅₀ (%)	0	25	50	75	100	150
<i>Degenerativní změny buněk</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Nekróza/deskvamace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Mitotická aktivita</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Intersticiální otok</i>	0 ± 1	4 ± 1,5*	3 ± 0,75*	3 ± 1*	3 ± 0*	2,5 ± 1,8*
<i>Intraalveolární otok</i>	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 0*	1 ± 1	1 ± 0*	1 ± 0*
<i>Hyperémie</i>	0 ± 0	2 ± 0*	4 ± 1,5*	3 ± 0,75*	3 ± 1*	3 ± 0*
<i>Krvácení</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Zánětlivá infiltrace</i>	0 ± 0	0 ± 0,5	0 ± 0,8	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny cév</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny dýchacích cest</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

0 = kontrolní skupina

Semikvantitativní skóre: 0 – žádný nález, 1 – ojedinělé změny (<12 %), 2 – mírné změny (<22 %), 3 – středně závažné změny (<45 %), 4 – závažné změny (> 45 %).

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *

Signifikantní změny ve srovnání s kontrolou (příloha 7 a 8) byly zjištěny v plicní tkáni i 7. den, a to ve všech intoxikovaných skupinách. Při dávkách 25 %–100 % LD₅₀ je patrná významná multifokálně zvýšená hyperémie a slabá, nicméně signifikantní

granulocytární infiltrace. U dávky 100 % LD₅₀ se k tomuto nálezu přidává i těžký intersticiální a místy i intraalveolární otok (příloha 9, 10; tab. 22).

Tab. 22 Histopatologické nálezy v plicní tkáni 7. den od intoxikace

LD ₅₀ (%)	7. den				
	0	25	50	75	100
<i>Degenerativní změny buněk</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Nekróza/deskvamace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Mitotická aktivita</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Intersticiální otok</i>	1 ± 1	2 ± 0	1 ± 1,5	2 ± 0,5	4 ± 0*
<i>Intraalveolární otok</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0,5	1 ± 0*
<i>Hyperémie</i>	0 ± 0	2 ± 0*	2 ± 0,5*	2 ± 0,3*	2 ± 0,5*
<i>Krvácení</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Zánětlivá infiltrace</i>	0 ± 0	1 ± 0*	1 ± 0*	1 ± 0*	2 ± 0*
<i>Patologické změny cév</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny dýchacích cest</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

0 = kontrolní skupina

Semikvantitativní skóre: 0 – žádný nález, 1 – ojedinělé změny (<12 %), 2 – mírné změny (<22 %), 3 – středně závažné změny (<45 %), 4 – závažné změny (> 45 %).

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *

Histopatologické vyšetření plicní tkáně bylo navíc doplněno hodnocením vzdušnosti prostřednictvím počítačové analýzy obrazu. V třídením intervalu medián hodnot klesl o 5 %, 8 %, 8 %, 10 % a 11 % po intoxikaci 25 %, 50 %, 75 %, 100 % a 150 % LD₅₀. Výrazné snížení bylo zaznamenáno také u myši v pětidením intervalu. Při stejných dávkách činil pokles mediánu hodnot 10 %, 7 %, 7 %, 11 % a 13 %. V sedmidenním intervalu byl signifikantní nález patrný pouze při dávce 100 % LD₅₀, u které došlo k 13% poklesu mediánu vzdušnosti plicní tkáně (tab. 23).

Tab. 23 Medián vzdušnosti plicní tkáně po perkutánní intoxikaci yperitem ± IQR

Vzdušnost (%)	LD ₅₀ (%)					
	0	25	50	75	100	150
3 dny	73 ± 3	69 ± 3*	67 ± 4*	67 ± 4*	66 ± 4*	65 ± 3*
5 dní	70 ± 2	63 ± 3*	65 ± 3*	65 ± 3*	62 ± 4*	61 ± 5*
7 dní	71 ± 2	68 ± 5	72 ± 4	70 ± 3	62 ± 9*	–

0 = kontrolní skupina

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *.

7.2.6 Histopatologické vyšetření ledvin

V třídním intervalu nebyly v tkáních ledvin pozorovány jakékoliv signifikantní změny v histopatologickém obraze (tab. 24).

Tab. 24 Histopatologické nálezy v ledvinách 3. den od intoxikace

LD ₅₀ (%)	3. den					
	0	25	50	75	100	150
<i>Degenerativní změny buněk</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Apoptóza/nekróza/deskvamace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Mitotická aktivita</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Proteinurie</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Tubulární kongesce</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Otok</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Hyperémie</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Krvácení</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Zánětlivá infiltrace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny cév</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny tuku (hilus)</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

0 = kontrolní skupina

Semikvantitativní skóre: 0 – žádný nález, 1 – ojedinělé změny (<12 %), 2 – mírné změny (<22 %), 3 – středně závažné změny (<45 %), 4 – závažné změny (> 45 %).

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *

Pátý den od intoxikace nebyly patrné signifikantní změny v jednotlivých patologiích u většiny intoxikovaných skupin. Jediný statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině (příloha 11 a 12) byl nalezen u zvířat, kterým byla podána 150 % LD₅₀ (příloha 13 a 14). V této skupině vykazovalo pět myši mírně zvýšenou tubulární kongesci oproti kontrolní skupině. Tento nález (ojedinělého rozsahu) byl pozorovatelný i ve skupině otrávené 100 % LD₅₀, neměl však statistický významný charakter, neboť postihoval pouze tři ze šesti myši (tab. 25).

Tab. 25 Histopatologické nálezy v ledvinách 5. den od intoxikace

LD ₅₀ (%)	5. den					
	0	25	50	75	100	150
<i>Degenerativní změny buněk</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Apoptóza/nekróza/deskvamace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Mitotická aktivita</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Proteinurie</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Tubulární kongescce</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 1	1 ± 0,8*
<i>Otok</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Hyperémie</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Krvácení</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Zánětlivá infiltrace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny cév</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny tuku (hilus)</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

0 = kontrolní skupina

Semikvantitativní skóre: 0 – žádný nález, 1 – ojedinělé změny (<12 %), 2 – mírné změny (<22 %), 3 – středně závažné změny (<45 %), 4 – závažné změny (> 45 %).

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *

Dle výsledků znázorněných v tab. 26 nebyl 7. den po otravě yperitem v porovnání s kontrolní skupinou v jednotlivých patologiích statisticky signifikantní rozdíl.

Tab. 26 Histopatologické nálezy v ledvinách 7. den od intoxikace

LD ₅₀ (%)	7. den				
	0	25	50	75	100
<i>Degenerativní změny buněk</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Apoptóza/nekróza/deskvamace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Mitotická aktivita</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Proteinurie</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Tubulární kongesce</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Otok</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Hyperémie</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Krvácení</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Zánětlivá infiltrace</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny cév</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Patologické změny tuku (hilus)</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

0 = kontrolní skupina

Semikvantitativní skóre: 0 – žádný nález, 1 – ojedinělé změny (<12 %), 2 – mírné změny (<22 %), 3 – středně závažné změny (<45 %), 4 – závažné změny (> 45 %).

Statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolní skupině: $p \leq 0,05$ – *

8 DISKUZE

Ačkoliv našel yperit největší použití v průběhu 1. světové války, stále zde existuje vysoké riziko jeho zneužití a expozice lidského organismu. Z tohoto hlediska pomáhá experimentální výzkum dávkové a časové závislosti působení yperitu pochopit patogenezí poškození, může napovědět, jakým způsobem lze toto poškození mírnit nebo léčit a může rovněž významně přispět k rozšíření škály ukazatelů, pomocí kterých lze stupeň poškození hodnotit.

Ve stávající diplomové práci jsme se zaměřili na hodnocení ukazatelů oxidačního stresu a histopatologických změn v myších játrech, ledvinách a plicích po expozici yperitu v dávkách odpovídajících 25 %, 50 %, 75 %, 100 % a 150 % LD₅₀ v intervalu tří, pěti a sedmi dnů. Pro tento účel bylo nutné nejprve stanovit LD₅₀ u laboratorních myší samic kmene C57Bl/6J v třicetidenním intervalu. Výběr pohlaví vycházel z experimentálních zkušeností pracovníků Katedry toxikologie (FVZ UO), dle kterých jsou samice méně agresivní ve srovnání se samci. V případě imunosuprese, kterou yperit vyvolává (Hassan a Ebtekar 2001), u nich tak hrozí nižší riziko poranění. Vlastní nastavení dávkovacího schématu pro experimentální model 1 vycházelo z literárních rešerší a testovacího experimentu. Dle rešerší se nepodařilo dohledat LD₅₀ pro námi zvolený kmen C57Bl/6J, nicméně u jiných druhů myší a potkanů kmene Wistar se tato dávka pohybuje mezi 5,8–196 mg/kg (Anshoo et al. 2005, Dube et al. 1998, Gautam et al. 2006, Misik et al. 2013, Perharic-Walton et al. 1991). Proto bylo v rámci testovacího experimentu použito celkem 8 myší rozdělených do 4 skupin (n=2). Těmto myším byl yperit aplikován stejným způsobem, jako zvířatům v experimentálním modelu 1 a 2, tedy na oholenou pokožku zad, a to ve čtyřech různých dávkách 10, 50, 100 a 200 mg/kg. U myší exponovaných dávkám 10 a 50 mg/kg nebylo pozorováno žádné úmrtí nebo výraznější váhové změny. Při dávce 100 mg/kg neuhynula žádná z myší. Obě však vykazovaly pokles tělesné hmotnosti (>10 %), který dosáhl minima 6.–7. den po otravě. Následně byl růst jejich váhy obnoven. Myši exponované dávkou 200 mg/kg zemřely 4. a 5. den po intoxikaci.

Pro stanovení LD₅₀ bylo proto zvoleno šest různých dávek yperitu v rozmezí 75–200 mg/kg. U všech intoxikovaných skupin došlo během sledovaného období k úmrtí zvířat, přičemž dávky 175 mg/kg a 200 mg/kg již byly supraletální. Následně byla na základě výsledků z přežívání prostřednictvím probitové analýzy stanovena LD₅₀

na hodnotě 109,2 mg/kg (91,2–124,2 mg/kg). Dávka tak svým rozsahem odpovídá LD₅₀ publikované pro perkutánní intoxikaci u člověka nebo králíka. U obou činí tato hodnota 100 mg/kg (Jošt et al. 2018, Perharic-Walton et al. 1991). Naopak u jiných myších kmenů nacházíme LD₅₀ v odlišných rozmezích. Myši kmene Swiss albino mají LD₅₀ mezi 5,8–9,7 mg/kg (Gautam a Vijayaraghavan 2007, Kulkarni et al. 2006, Kumar et al. 2007, Sharma et al. 2008), zatímco u kmene Balb/c je tato hodnota 15,5 mg/kg (Venkateswaran et al. 1994). Námí zvolený kmen myši C57Bl/6J se tak jeví jako více odolný vůči působení yperitu. Podobné výsledky lze nalézt i v případě působení jiné genotoxické noxy jako je ionizující záření. Z pohledu ionizujícího záření je kmen C57Bl/6J obecně považován za radiorezistentní, zatímco kmeny Swiss albino a Balb/c jsou radiosenzitivní (Samarth a Kumar 2003, Singh et al. 2015). Mechanistické vysvětlení tohoto jevu je známo pouze u myši Balb/c, u kterých byl nalezena snížená exprese a aktivita katalytické subjednotky DNA-PK korelující se sníženou schopností reparovat poškození DNA (Okayasu et al. 2000).

Na základě výsledků z prvního experimentálního modelu byl myším v experimentálním modelu 2 podán yperit v dávkách odpovídajících 25 %, 50 %, 75 %, 100 % a 150 % LD₅₀. Před vlastním odběrem orgánů byly myši nejprve zváženy a byla hodnocena změna jejich tělesné hmotnosti. Intoxikace LD₅₀ ≥ 75 % vyvolala váhový pokles přetrvávající po celou dobu experimentu. Svoji roli mohlo sehrát nechutenství, poškození GIT či změny metabolismu spojované s yperitem (Rosemond et al. 2003). Dávky ≤ 50 % LD₅₀ významný váhový pokles nevyvolaly. Naopak u 50 % LD₅₀ došlo po týdnu ke zvýšení hmotnosti zvířat. Mechanismus vysvětlující tento nález není znám. Lze pouze předpokládat, že po počátečním poškození mohou být vystupňovány reparační procesy a stimulován anabolický stav organismu. V literatuře se nicméně nepodařilo dohledat jakýkoliv vztah mezi yperitem a krevními hladinami anabolických hormonů, jako jsou například somatotropin (STH) nebo insulinu podobný faktor-1 (IGF-1).

Následoval vlastní odběr orgánů a zhodnocení ukazatelů oxidačního stresu v kontextu histopatologických změn. Játra jsou metabolicky velmi aktivním orgánem (Ding et al. 2018). Na jednotlivé dávky yperitu tento orgán reaguje odlišným způsobem. Při 25 % LD₅₀ došlo v intervalu 3–7 dnů po otravě pouze k nárůstu hodnot FRAP. Tato metoda slouží ke zjištění koncentrace antioxidantů s nízkou molekulovou hmotností, nedokáže však jednotlivé antioxidanty mezi sebou rozlišit (Pohanka 2012a). Vlivem

oxidačního stresu dochází ke spotřebě antioxidantů (Sharifi-Rad et al. 2020). Jejich zvýšené hodnoty lze na druhou stranu vnímat jako kompenzační reakci a signál rozvinuté antioxidační odpovědi (Pohanka 2012a). U poloviční LD₅₀ má působení oxidačního stresu protražovanější dopad a kompenzace je tak patrná až 7. den po intoxikaci. Tato dávka rovněž vyvolala nesignifikantní nárůst mitotické aktivity v pěti a sedmidenním intervalu. Její přítomnost by mohla naznačovat zvýšenou apoptotickou aktivitu předcházející třídennímu intervalu. U myši, které byly vystaveny ≥ 75 % LD₅₀, je poškození genetického materiálu však natolik rozsáhlé, že je vyšší apoptotická aktivita pozorována i 3 dny po expozici. Následuje její pokles a opětovný nárůst v sedmidenním intervalu. Tento bifázický průběh indikuje perzistenci poškození DNA. Toto poškození může vést k apoptóze hepatocytů i v pozdější fázi po intoxikaci yperitem a vyvolat zánětlivou odpověď (Nakad a Schumacher 2016) korelující s obnovou imunitního systému, jak naznačují počty ostrůvků extramedulární hematopoézy a infiltrace granulocyty (Nakad a Schumacher 2016). Vysoké dávky yperitu zřejmě vedou i k útlumu metabolické aktivity s převahou katabolických dějů. V jaterních buňkách se tak s latencí a v závislosti na dávce yperitu hromadí tukové kapénky nebo dochází k rozvoji atrofie. Tímto histopatologickým obrazem se myši kmene C57Bl/6J odlišují od kmene Swiss albino, u kterého již 3. den po perkutánní aplikaci 100 % LD₅₀ yperitu dochází k rozvoji převážně granulovakuolárních změn představující otok hepatocytů s perinukleárním shlukováním cytoplazmy (Sharma et al. 2010). Pokles úrovně bazálního metabolismu a s ním spojený úbytek fyziologické tvorby ROS by rovněž vysvětloval snížení hodnot TBARS (Pohanka et al. 2013), jež odráží míru peroxidace lipidů (Pyles et al. 1993). Převaha katabolismu by navíc pomáhala objasnit nárůst hladiny oxidantů pozorovaný zejména v pětidenním intervalu, které by v tomto případě místo de-novo syntézy mohly být nahrazovány nadměrným štěpením složitější organických látek.

Plicní tkáň vykazuje v porovnání s jaterní tkání vůči účinkům yperitu v několika ohledech odlišnou odpověď. Z histopatologického hlediska se tato tkáň jeví jako citlivější, neboť změny je možné pozorovat již po expozici 25 % LD₅₀. V plicní tkáni jsou přítomny dynamické bariéry v podobě plicních epitelálních a cévních endotelálních buněk, které společně tvoří polopropustné rozhraní a brání rozvoji edému (Barabutis et al. 2016, Simmons et al. 2019). Vlivem yperitu došlo k poškození těchto bariér a tvorbě intersticiálních a v závislosti na dávce i mnohočetných fokálních

alveolárních otoků, které v konečném důsledku snížily vzdušnost plicní tkáně. Přesné mechanismy, jakými může yperit tyto bariéry narušit, není znám. Yperit může tyto bariéry narušit jednak přímým poškozením buněk, ale také nepřímo, prostřednictvím ROS, cytokinů, růstových hormonů nebo aktivovaných leukocytů (Barabutis et al. 2016, Emad a Emad 2007). Kombinace přímých i nepřímých mechanismů by navíc mohla vysvětlovat rozdíly účinků měřené v tří a pětidenním intervalu. V třídenním intervalu vykazoval pokles vzdušnosti plicní tkáně dávkově závislý charakter, zatímco 5. den po intoxikaci nebyl mezi jednotlivými dávkami nalezen statisticky významný rozdíl. V pětidenním intervalu tak může při nižších dávkách docházet k zesílení přímého poškození vlivem imunitního systému, který je naopak při vyšších dávkách suprimován (Hassan a Ebtekar 2001). V sedmidenním intervalu je pak možné ve skupinách intoxikovaných 25–75 % LD₅₀ pozorovat postupnou regeneraci stavu. Podobně jako v jaterní tkáni zde ale přetrvává poškození, které v tomto časovém intervalu vede k tvorbě ložisek infiltrovaných granulocyty. Na rozdíl od jater lze však tuto reakci pozorovat již při 25 % LD₅₀, což koreluje s nižší schopností plicní tkáně reparovat poškození DNA vyvolané yperitem (Yue et al. 2015). Odlišnosti lze také nalézt při porovnání ukazatelů oxidačního stresu. Po otravě yperitem sice došlo k poklesu hodnot TBARS, toto snížení ale nastalo již při dávce 75 % LD₅₀ a bylo pozorováno až v pěti a sedmidenním intervalu. Vysvětlení tohoto jevu by mohlo souviset s nižší mírou bazální metabolické aktivity plicní tkáně (Wang et al. 2010). Při dostatečné kapacitě enzymů energetického metabolismu a současné zástavě jejich exprese vlivem yperitu by tak tento jev mohl nastat s delší latencí. Nižší schopnost reparace poškození DNA by poté vysvětlovala delší perzistenci nálezu (Yue et al. 2015). V případě FRAP jsou rozdíly patrné zejména po otravě dávkami odpovídajícími 25 % a 50 % LD₅₀. Na rozdíl od jater měl nárůst tohoto ukazatele pouze přechodný charakter nebo tato odpověď zcela chyběla. Roli zde opět mohla sehrát nižší schopnost plicní tkáně opravovat změny DNA bránící kompenzační (de-novo) syntéze nízkomolekulárních antioxidantů.

Posledním hodnoceným orgánem byly ledviny. Ve srovnání s játry a plícemi se z histopatologického hlediska jednalo o orgán s nejvyšší odolností vůči yperitu. Ve sledovaných časových intervalech představovala signifikantní změnu pouze mírná tubulární kongesce pozorovaná 5. den po aplikaci 150 % LD₅₀. Vzhledem k nepřítomnosti dalších změn má tento nálezu pravděpodobně základ v narušení

transportních funkcí vedoucích ke stagnaci tekutiny v renálních tubulech. Tímto znakem se myši kmene C57Bl/6J významně liší od kmene Swiss albino. U kmene Swiss albino vedla aplikace 100 % LD₅₀ v intervalu 3 a 7 dnů po intoxikaci navíc k významné proteinurii, krvácení do tkáně a k nekrotickým, apoptotickým a degenerativním změnám výstelky tubulů (Sharma et al. 2010). Podobně jako u ostatních orgánů je i v ledvinách expozice yperitu spojena s poklesem TBARS. Ten však mohou tranzitorně vyvolat i dávky nižší než 75 % LD₅₀. Pokud bychom nakonec hodnotili citlivost ledvin z pohledu oxidačního stresu, jeví se renální tkáň naopak jako velmi senzitivní. Přejídný vzestup hladiny antioxidantů pozorovaný 3. a 5. den po expozici byl totiž pozorován již při aplikaci 50 % LD₅₀.

9 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit ukazatele oxidačního stresu 3., 5. a 7. den po percutánní intoxikaci yperitem metodami TBARS (hodnotí rozvoj poškození lipidů zapříčiněný oxidační zátěží) a FRAP (vypovídá o vyrovnání organismu s oxidačním stresem) v kontextu histopatologických změn. Hodnoceny byly změny v játrech, plicích a ledvinách u myších samic kmene C57Bl/6J, kterým byl yperit aplikován na oholenou kůži zad.

Nejprve byla stanovena LD₅₀ (109,2 mg/kg) a následně došlo k intoxikaci myši v dávkách odpovídajících 25 %, 50 %, 75 %, 100 % a 150 % LD₅₀. Ve všech sledovaných orgánech byl u hodnot TBARS patrný spíše pokles. V játrech nastal pouze po aplikaci dávek ≥ 100 % LD₅₀ v tří-, eventuálně pětidenním intervalu. V plicích mohl být pozorován až od 5. dne pouze při dávkách ≥ 75 % LD₅₀. Zatímco v ledvinách ve všech časových intervalech při dávkách ≥ 50 % LD₅₀ a přechodně i při dávkách nižších. Hladiny FRAP byly ve většině případů naopak zvýšené, což indikuje rozvinutou kompenzační reakci organismu.

Histopatologické změny v játrech byly pozorovány po otravě dávkami ≥ 100 % LD₅₀ a měly nejprve charakter zvýšené apoptotické aktivity v třídenním intervalu přecházející postupně přes atroficko-degenerativní změny k opětovnému zvýšení apoptotické aktivity v sedmidenním intervalu společně se zánětlivou infiltrací korelující s obnovou hematopoézy. Plicní tkáň se ze všech hodnocených orgánů z histopatologického hlediska jeví jako nejvíce senzitivní. Rozsáhlé histopatologické změny se projeví již při dávkách ≥ 25 % LD₅₀. V čase tři a pět dní po intoxikaci došlo k rozvoji otoku, který snížil vzdušnost plicní tkáně. V sedmidenním intervalu byla patrná regenerace s výjimkou aplikace 100 % LD₅₀. Ve všech hodnocených dávkách byla navíc v tomto časovém intervalu patrná mírně zvýšená zánětlivá infiltrace. Ledviny vykazovaly nejnižší senzitivitu z pohledu morfologického poškození, což potvrzuje pouze tubulární kongesce zaznamenaná 5. den po podání nejvyšší dávky yperitu.

Výsledky diplomové práce prokázaly, že yperit vyvolává dávkově a časově závislé změny parametrů oxidačního stresu a histopatologického obrazu v jaterní, plicní a ledvinné tkáni po percutánní intoxikaci. Myši kmene C57Bl/6J lze považovat za model vhodný pro další experimentální výzkum.

10 LITERATURA

Anderson, D.R., Byers, S.L., Vesely, K.R. (2000). Treatment of sulfur mustard (HD)-induced lung injury. *J Appl Toxicol.* 20(1). 129–132. [https://doi.org/10.1002/1099-1263\(200012\)20:1+<::AID-JAT670>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1099-1263(200012)20:1+<::AID-JAT670>3.0.CO;2-X)

Anshoo, G., Singh, S., Kulkarni, A.S., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R. (2005). Protective effect of Aloe vera L. gel against sulphur mustard-induced systemic toxicity and skin lesions. *Indian Journal of Pharmacology.* 37(2). 103–110. Dostupné na URL: <http://www.ijp-online.com/text.asp?2005/37/2/103/15110>. Přístup 4. 9. 2020

Bajgar, J., Fusek, J., Hrdina, V. (1991). *Vojenská toxikologie.* Hradec Králové: Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně. ISBN 978-80-85109-36-8

Balali-Mood, M., Balali-Mood, B. (2009). Sulphur Mustard Poisoning and Its Complications in Iranian Veterans. *Iranian Journal of Medical Sciences.* 34(3). 155–171. Dostupné na URL: https://ijms.sums.ac.ir/article_39882.html. Přístup 16. 1. 2020

Balali-Mood, M., Hefazi, M. (2005). The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 19(3). 297–315. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2005.00325.x>

Balali-Mood, M., Hefazi, M. (2006). Comparison of Early and Late Toxic Effects of Sulfur Mustard in Iranian Veterans. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 99(4). 273–282. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_429.x

Barabutis, N., Verin, A., Catravas, J. D. (2016). Regulation of pulmonary endothelial barrier function by kinases. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 311(5). L832–L845. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00233.2016>

Batal, M., Boudry, I., Cléry-Barraud, C., Mouret, S., Douki, T. (2013). Relative yields of monomeric and dimeric adducts induced by sulphur mustard in isolated and cellular DNA as determined by HPLC/tandem mass spectrometry. *Toxicological & Environmental Chemistry.* 95(2). 260–276. <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.758729>

- Borak, J., Sidell, F.R. (1992).** Agents of chemical warfare: Sulfur mustard. *Annals of Emergency Medicine*. 21(3). 303–308. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(05\)80892-3](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(05)80892-3)
- Dacre, J.C., Goldman, M. (1996).** Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard. *Pharmacological Reviews*. 48(2). 289–326. Dostupné na URL: <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/48/2/289>. Přístup 9. 12. 2019
- Ding, H., Wang, J., Ren, H., Shi, X. (2018).** Lipometabolism and Glycometabolism in Liver Diseases. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2018/1287127>
- Dube, S.N., Husain, K., Sugendran, K., Vijayaraghavan, R., Somani, S.M. (1998).** Dose response of sulphur mustard: behavioral and toxic signs in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*. 42(3). 389–394. Dostupné na URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9741654/>. Přístup 4. 9. 2020
- Emad, A., Emad, Y. (2007).** Levels of cytokine in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in patients with pulmonary fibrosis due to sulfur mustard gas inhalation. *J Interferon Cytokine Res*. 27(1). 38–43. <https://doi.org/10.1089/jir.2006.0084>
- Etezzad-Razavi, M., Mahmoudi, M., Hefazi, M., Balali-Mood, M. (2006).** Delayed ocular complications of mustard gas poisoning and the relationship with respiratory and cutaneous complications. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. 34(4). 342–346. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2006.01220.x>
- Fidder, A., Moes, G.W.H., Scheffer, A.G., van der Schans, G.P., Baan, R.A., de Jong, L.P.A., Benschop, H.P. (1994).** Synthesis, Characterization, and Quantitation of the Major Adducts Formed between Sulfur Mustard and DNA of Calf Thymus and Human Blood. *Chemical Research in Toxicology*. 7(2). 199–204. <https://doi.org/10.1021/tx00038a013>
- Fitzgerald, G.J. (2008).** Chemical Warfare and Medical Response During World War I. *American Journal of Public Health*. 98(4). 611–625. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2007.11930>
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G. (2006).** Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*. 13(9). 1423–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950>

Gautam, A., Vijayaraghavan, R. (2007). Prophylactic effect of gossypin against percutaneously administered sulfur mustard. *Biomed Environ Sci.* 20(3). 250–259. Dostupné na URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17672217/>. Přístup 4. 9. 2020

Gautam, A., Vijayaraghavan, R., Sharma, M., Ganesan, K. (2006). Comparative Toxicity Studies Of Sulfur Mustard (2,2'-Dichloro Diethyl Sulfide) And Monofunctional Sulfur Mustard (2-Chloroethyl Ethyl Sulfide), Administered Through Various Routes In Mice. *J Med CBR Def.* Dostupné na URL: https://www.researchgate.net/publication/242291456_Comparative_Toxicity_Studies_Of_Sulfur_Mustard_22%27-Dichloro_Diethyl_Sulfide_And_Monofunctional_Sulfur_Mustard_2-Chloroethyl_Ethyl_Sulfide_Administered_Through_Various_Routes_In_Mice. Přístup 4. 9. 2020

Ghabili, K., Agutter, P.S., Ghanei, M., Ansarin, K., Panahi, Y., Shoja, M.M. (2011). Sulfur mustard toxicity: History, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Critical Reviews in Toxicology.* 41(5). 384–403. <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.541224>

Ghabili, K., Agutter, P.S., Ghanei, M., Ansarin, K., Shoja, M.M. (2010). Mustard gas toxicity: the acute and chronic pathological effects. *Journal of Applied Toxicology.* 30(7). 627–643. <https://doi.org/10.1002/jat.1581>

Ghasemi, H., Ghazanfari, T., Babaei, M., Soroush, M.R., Yaraee, R., Ghassemi-Broumand, M., Javadi, M.A., Foroutan, A., Mahdavi, M.R.V., Shams, J., Pourfarzam, S., Moaiedmohseni, S., Nadoushan, M.R.J., Owlia, P., Panahi, Y., Hassan, Z.M., Faghihzadeh, S. (2008). Long-term ocular complications of sulfur mustard in the civilian victims of sardasht, iran. *Cutaneous and Ocular Toxicology.* 27(4). 317–326. <https://doi.org/10.1080/15569520802404382>

Graef, I., Karnofsky, D.A. (1948). The clinical and pathologic effects of the nitrogen and sulfur mustards in laboratory animals. *The American journal of pathology.* 24(1). 1–47. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1942736/>. Přístup 14. 3. 2020

Hassan, Z.M., Ebtekar, M. (2001). Modeling for immunosuppression by sulfur mustard. *Int Immunopharmacol.* 1(3). 605–610. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(00\)00036-9](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(00)00036-9)

Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* 193(1–2). 3–34. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00287-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00287-7)

Ishida, H., Ray, R., Ray, P. (2008). Sulfur mustard downregulates iNOS expression to inhibit wound healing in a human keratinocyte model. *Journal of Dermatological Science.* 49(3). 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.09.002>

Jackson, S.P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis.* 23(5). 687–696. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.5.687>

Jafari, M. (2007). Dose- and time-dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. *Toxicology.* 231(1). 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.048>

Javadi, M., Yazdani, S., Sajjadi, H., Jadidi, K., Karimian, F., Einollahi, B., Jafarinasab, M., Zare, M. (2005). Chronic and Delayed-Onset Mustard Gas Keratitis Report of 48 patients and review of literature. *Ophthalmology.* 112(4). 617–625.e2. <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2004.09.027>

Jiang, A., Maibach, H. (2018). Dermatotoxicology of sulfur mustard: Historical perspectives from World War I. *Journal of Applied Toxicology.* 38(1). 108–112. <https://doi.org/10.1002/jat.3524>

Jílková Martina. Oprava poškození DNA vyvolaného sirným yperitem a jeho vztah k cytotoxicitě. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2008:65 s.

Jošt, P., Múčková, E., Štětina, R., Pejchal, J. (2018). SULFUR MUSTARD: PERSISTING THREAT. *Military Medical Science Letters.* 87(3). 106–118. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2018.021>

Jowsey, P.A., Williams, F.M., Blain, P.G. (2009). DNA damage, signalling and repair after exposure of cells to the sulphur mustard analogue 2-chloroethyl ethyl sulphide. *Toxicology*. 257(3). 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.12.001>

Jowsey, P.A., Williams, F.M., Blain, P.G. (2012). DNA damage responses in cells exposed to sulphur mustard. *Toxicology Letters*. 209(1). 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.009>

Kassa, J., Krs, O., Cabal, J. (1992). *Základy vojenské toxikologie a ochrany proti BCHL*. Hradec Králové: Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně. ISBN 80-85109-66-2

Kehe, Kai, Balszuweit, F., Emmler, J., Kreppel, H., Jochum, M., Thiermann, H. (2008). Sulfur mustard research-strategies for the development of improved medical therapy. *Eplasty*. 8. e32. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2431646/>. Přístup 22. 1. 2020

Kehe, K., Szinicz, L. (2005). Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology*. 214(3). 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.014>

Kehe, K., Thiermann, H., Balszuweit, F., Eyer, F., Steinritz, D., Zilker, T. (2009). Acute effects of sulfur mustard injury—Munich experiences. *Toxicology*. 263(1). 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.060>

Kulkarni, A.S., Vijayaraghavan, R., Anshoo, G., Satish, H.T., Pathak, U., Raza, S.K., Pant, S.C., Malhotra, R.C., Prakash, A.O. (2006). Evaluation of analogues of DRDE-07 as prophylactic agents against the lethality and toxicity of sulfur mustard administered through percutaneous route. *J. Appl. Toxicol.* 26. 115-125. <https://doi.org/10.1002/jat.1114>

Kumar, O., Kulkarni, A.S., Nashikkar, A.B., Vijayaraghavan, R. (2007). PROTECTIVE EFFECT OF QUERCETIN ON SULPHUR MUSTARD INDUCED OXIDATIVE STRESS IN MICE. *Journal of Cell and Tissue Research*. 7(2). 1173–1179. Dostupné na URL: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1088.3231&rep=rep1&type=pdf>. Přístup 4. 9. 2020

Kumar, O., Sugendran, K., Vijayaraghavan, R. (2001). Protective effect of various antioxidants on the toxicity of sulphur mustard administered to mice by inhalation or percutaneous routes. *Chem Biol Interact.* 134(1). 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00209-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00209-X)

LiverTox (2019). Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548509/>. Přístup 25. 8. 2020

Malaviya, R., Sunil, V.R., Cervelli, J., Anderson, D.R., Holmes, W.W., Conti, M.L., Gordon, R.E., Laskin, J.D., Laskin, D.L. (2010). Inflammatory effects of inhaled sulfur mustard in rat lung. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 248(2). 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.07.018>

Malhotra, R.C., Ganesan, K., Sugendran, K., Swamy, R.V. (1999). Chemistry and Toxicology of Sulphur Mustard – Review. *Defence Science Journal.* 49(2). 97–116. <https://doi.org/10.14429/dsj.49.3793>

Marchenko, N.D., Moll, U.M. (2014). Mitochondrial death functions of p53. *Molecular & cellular oncology.* 1(2). <https://doi.org/10.1080/23723548.2014.955995>

Marrs, T.C., Maynard, R.L., Sidell, F.R. (2007). *Chemical warfare agents: toxicology and treatment, 2nd ed.* Hoboken, New Jersey: Wiley. ISBN 978-0-470-01359-5

Masta, A., Gray, P.J., Phillips, D.R. (1996). Effect of sulphur mustard on the initiation and elongation of transcription. *Carcinogenesis.* 17(3). 525–532. <https://doi.org/10.1093/carcin/17.3.525>

Matoušková, M., Ruttkay-Nedecký, B., Kizek, R. (2014). Antioxidační enzymy – biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies.* 1(3). pp.53–56. Dostupné na URL: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/index.html. Přístup 25. 8. 2020

McManus, J., Huebner, K. (2005). Vesicants. *Critical Care Clinics.* 21(4). 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2005.06.005>

- Misik, J., Jost, P., Pavlikova, R., Vodakova, E., Cabal, J., Kuca, K. (2013).** A comparison of decontamination effects of commercially available detergents in rats pre-exposed to topical sulphur mustard. *Cutan Ocul Toxicol.* 32(2). 135-139. <https://doi.org/10.3109/15569527.2012.730087>
- Nakad, R., Schumacher, B. (2016).** DNA Damage Response and Immune Defense: Links and Mechanisms. *Frontiers in Genetics.* <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00147>
- Niki, E. (2014).** Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects.* 1840(2). 809–817. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.020>
- Nishizuka, S., Ramalingam, S., Spurrier, B., Washburn, F.L., Krishna, R., Honkanen, P., Young, L., Shimura, T., Steeg, P.S., Austin, J. (2008).** Quantitative Protein Network Monitoring in Response to DNA Damage. *Journal of Proteome Research.* 7(2). 803–808. <https://doi.org/10.1021/pr0702971>
- Noll, D.M., Mason, T.M., Miller, P.S. (2006).** Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. *Chemical Reviews.* 106(2). 277–301. <https://doi.org/10.1021/cr040478b>
- Nourani, M.R., Mahmoodzadeh Hosseini, H., Azimzadeh Jamalkandi, S., Imani Fooladi, A.A. (2016).** Cellular and molecular mechanisms of acute exposure to sulfur mustard: a systematic review. *Journal of Receptors and Signal Transduction.* 37(2). 200–216. <https://doi.org/10.1080/10799893.2016.1212374>
- Okayasu, R., Suetomi, K., Yu, Y., Silver, A., Bedford, J.S., Cox, R., Ullrich, R.L. (2000).** A deficiency in DNA repair and DNA-PKcs expression in the radiosensitive BALB/c mouse. *Cancer Res.* 60(16). 4342–4345. Dostupné na URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10969773/>. Přístup 4. 9. 2020

O'Neill, H.C., White, C.W., Veress, L.A., Hendry-Hofer, T.B., Loader, J.E., Min, E., Huang, J., Rancourt, R.C., Day, B.J. (2010). Treatment with the catalytic metalloporphyrin AEOL 10150 reduces inflammation and oxidative stress due to inhalation of the sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide. *Free Radical Biology and Medicine*. 48(9). 1188–1196. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.039>

Panahi, Y., Fattahi, A., Nejabati, H.R., Abroon, S., Latifi, Z., Akbarzadeh, A., Ghasemnejad, T. (2018). DNA repair mechanisms in response to genotoxicity of warfare agent sulfur mustard. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 58. 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.01.012>

Panahi, Y., Gholami, N., Ghojzadeh, M., Moslemi, F., Naghavi-Behzad, M., Azami-Aghdash, S., Ghaffari, A., Piri, R. (2015). Complications and Carcinogenic Effects of Mustard Gas – a Systematic Review and Meta-Analysis in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 16(17). 7567–7573. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.17.7567>

Pant, S.C., Lomash, V. (2016). Sulphur Mustard Induced Toxicity, Mechanism of Action and Current Medical Management. *Defence Life Science Journal*. 1(1). 07. <https://doi.org/10.14429/dlsj.1.10089>

Paromov, V., Suntres, Z., Smith, M., Stone, W.L. (2007). Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: role of oxidative stress, and antioxidant therapy. *Journal of burns and wounds*. 7. e7. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2064967/>. Přístup 22. 1. 2020

Patočka, J. (2016). SYRIA CONFLICT AND CHEMICAL WEAPONS: WHAT IS THE REALITY? *Military Medical Science Letters*. 85(1). 39–43. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2016.006>

Patočka, J., Bajgar, J., Cabal, J., Fusek, J., Herink, J., Kassa, J., Štětina, R. (2004). *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0608-3

Perharic-Walton, L., Maynard, R.L., Murray, V.S.G. (1991). Mustard Gas. *Internationally Peer Reviewed Chemical Safety Information*. Dostupné na URL: [http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/mustardg.htm#PartTitle:14.%20AUTHOR\(S\),%20REVIEWER\(S\),%20ADDRESS\(ES\),%20DATE\(S\)](http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/mustardg.htm#PartTitle:14.%20AUTHOR(S),%20REVIEWER(S),%20ADDRESS(ES),%20DATE(S)). Přístup 4. 9. 2020

Pita, R., Vidal-Asensi, S. (2010). Toxicología cutánea y sistémica de los agentes vesicantes de guerra. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 101(1). 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2009.07.012>

Pitschmann, V. (1999). *Historie chemické války*. Kounice: Military System Line. ISBN 978-80-902669-0-2

Pitschmann, V. (2005). *Analýza toxických látek detekčními trubičkami*. Drahelčice: Econt Consulting. ISBN 978-80-86664-03-3

Pitschmann, V. (2012). *Chemici v laboratoři a na bitevním poli: kapitoly z dějin chemických, toxinových a zápalných zbraní: období od roku 1914 do roku 1945*. Praha: Naše vojsko. ISBN 978-80-206-1298-4

Pohanka, M. (2012a). *Vybrané laboratorní postupy v toxikologii*. Hradec Králové: Univerzita obrany. ISBN 978-80-7231-350-1

Pohanka, M. (2012b). Antioxidants Countermeasures Against Sulfur Mustard. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 12(8). 742–748. <https://doi.org/10.2174/138955712801264783>

Pohanka, M., Sobotka, J., Jilkova, M., Stetina, R. (2011a). Oxidative stress after sulfur mustard intoxication and its reduction by melatonin: efficacy of antioxidant therapy during serious intoxication. *Drug Chem Toxicol*. 34(1). 85–91. <https://doi.org/10.3109/01480545.2010.505238>

Pohanka, M., Sobotka, J., Stetina, R. (2011b). Sulfur mustard induced oxidative stress and its alteration by epigallocatechin gallate. *Toxicol Lett*. 201(2). 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.011>

Pohanka, M., Sobotka, J., Svobodova, H., Stetina, R. (2013). Sulfur mustard induced oxidative stress and its alteration using asoxime (HI-6). *Interdisciplinary Toxicology*. 6(4). 198–202. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0029>

Prymula, R., Bajgar, J., Beran, J., Fusek, J., Chlábek, R., Kassa, J., Šplíňo, M. (2002). *Biologický a chemický terorismus: informace pro každého*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-0288-9

Pyles, L.A., Stejskal, E.J., Einzig, S. (1993). Spectrophotometric Measurement of Plasma 2-Thiobarbituric Acid-Reactive Substances in the Presence of Hemoglobin and Bilirubin Interference. *Experimental Biology and Medicine*. 202(4). 407–419. <https://doi.org/10.3181/00379727-202-43552>

Reddy, G., Major, M.A., Leach, G.J. (2005). Toxicity Assessment of Thiodiglycol. *International Journal of Toxicology*. 24(6). 435–442. <https://doi.org/10.1080/10915810500368878>

Rimel, J.K., Taatjes, D.J. (2018). The essential and multifunctional TFIIF complex. *Protein Science*. 27(6). 1018–1037. <https://doi.org/10.1002/pro.3424>

Rosemond, Z.A., Beblo, D.A., Amata, R. (2003). Toxicological Profile for Sulfur Mustard. *Agency for Toxic Substances and Disease*. Dostupné na URL: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp49.pdf>. Přístup 5. 9. 2020

Rosenthal, D.S., Simbulan-Rosenthal, C.M.G., Iyer, S., Smulson, M.E., Spoonde, A., Smith, W., Ray, R. (1998). Sulfur Mustard Induces Markers of Terminal Differentiation and Apoptosis in Keratinocytes Via a Ca²⁺-Calmodulin and Caspase-Dependent Pathway. *Journal of Investigative Dermatology*. 111(1). 64–71. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00250.x>

Rowell, M., Kehe, K., Balszuweit, F., Thiermann, H. (2009). The chronic effects of sulfur mustard exposure. *Toxicology*. 263(1). 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.05.015>

Samarth, R.M., Kumar, A. (2003). Radioprotection of Swiss Albino Mice by Plant Extract *Mentha piperita* (Linn.). *Journal of Radiation Research*. 44(2). 101–109. <https://doi.org/10.1269/jrr.44.101>

Sauvaigo, S., Sarrazy, F., Batal, M., Caillat, S., Pitiot, B., Mouret, S., Cléry-Barraud, C., Boudry, I., Douki, T. (2016). Impact of topical application of sulfur mustard on mice skin and distant organs DNA repair enzyme signature. *Toxicol Lett.* 241. 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.11.001>

Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N.V., Zucca, P. et al. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>

Sharma, M., Pant, S.C., Pant, J.C., Vijayaraghavan, R. (2010). Nitrogen and sulphur mustard induced histopathological observations in mouse visceral organs. *J Environ Biol.* 31(6). 891–905. Dostupné na URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21506473/>. Přístup 28. 8. 2020

Sharma, D.R., Sunkaria, A., Bal, A., Bhutia, Y.D., Vijayaraghavan, R., Flora, S.J.S., Gill, K.D. (2009). Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of pro-apoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain. *Toxicol Appl Pharmacol.* 240(2). 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.06.015>

Sharma, M., Vijayaraghavan, R., Ganesan, K. (2008). Comparison of toxicity of selected mustard agents by percutaneous and subcutaneous routes. *Indian J Exp Biol.* 46(12). 822–830. Dostupné na URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19245179/>. Přístup 5. 9. 2020

Shohrati, M., Ghanei, M., Shamspour, N., Babaei, F., Abadi, M.N., Jafari, M., Ali, A.H. (2010). Glutathione and Malondialdehyde Levels in Late Pulmonary Complications of Sulfur Mustard Intoxication. *Lung.* 188(1). 77–83. <https://doi.org/10.1007/s00408-009-9178-y>

Shrivastav, M., De Haro, L.P., Nickoloff, J.A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research.* 18(1). 134–147. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.111>

- Schuler, M., Bossy-Wetzel, E., Goldstein, J.C., Fitzgerald, P., Green, D.R. (2000).** P53 Induces Apoptosis by Caspase Activation through Mitochondrial Cytochrome c Release. *Journal of Biological Chemistry*. 275(10). 7337–7342. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.7337>
- Simmons, S., Erfinanda, L., Bartz, C., Kuebler, W. M. (2019).** Novel mechanisms regulating endothelial barrier function in the pulmonary microcirculation. *The Journal of physiology*. 597(4). 997–1021. <https://doi.org/10.1113/JP276245>
- Singh, V.K., Newman, V.L., Berg, A.N., MacVittie, T.J. (2015).** Animal models for acute radiation syndrome drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 10(5). 497–517. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1023290>
- Tahmasbpour, E., Reza Emami, S., Ghanei, M., Panahi, Y. (2015).** Role of oxidative stress in sulfur mustard-induced pulmonary injury and antioxidant protection. *Inhalation Toxicology*. 27(13). 659–672. <https://doi.org/10.3109/08958378.2015.1092184>
- Tewari-Singh, N., Gu, M., Agarwal, C., White, C.W., Agarwal, R. (2010).** Biological and Molecular Mechanisms of Sulfur Mustard Analogue-Induced Toxicity in JB6 and HaCaT Cells: Possible Role of Ataxia Telangiectasia-Mutated/Ataxia Telangiectasia-Rad3-Related Cell Cycle Checkpoint Pathway. *Chemical Research in Toxicology*. 23(6). 1034–1044. <https://doi.org/10.1021/tx100038b>
- Valerie, K., Povirk, L.F. (2003).** Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*. 22(37). 5792–5812. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206679>
- Vandivier, R.W., Henson, P.M., Douglas, I.S. (2006).** Burying the Dead. *Chest*. 129(6). 1673–1682. <https://doi.org/10.1378/chest.129.6.1673>
- Venkateswaran, K.S., Neeraja, V., Sugendran, K., Gopalan, N., Vijayaraghavan, R., Pant, S.C., Prakash, A.O., Malhotra, R.C. (1994).** Dose dependent effects on lymphoid organs following a single dermal application of sulphur mustard in mice. *Hum Exp Toxicol*. 13(4). 247–251. <https://doi.org/10.1177/096032719401300404>

- Vidan, A., Luria, S., Eisenkraft, A., Hourvitz, A. (2002).** Ocular injuries following sulfur mustard exposure: clinical characteristics and treatment. *The Israel Medical Association Journal: IMAJ.* 4. 577–578. Dostupné na URL: https://www.researchgate.net/publication/11259356_Ocular_injuries_following_sulfur_mustard_exposure_Clinical_characteristics_and_treatment. Přístup 15. 1. 2020
- Vijayaraghavan, R., Kulkarni, A., Pant, S.C., Kumar, P., Lakshmana Rao, P.V., Gupta, N., Gautam, A., Ganesan, K. (2005).** Differential toxicity of sulfur mustard administered through percutaneous, subcutaneous, and oral routes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 202(2). 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.020>
- Wang, Z., Ying, Z., Bosy-Westphal, A., Zhang, J., Schautz, B., Later, W., Heymsfield, S.B., Müller, M.J. (2010).** Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure. *The American journal of clinical nutritio.* 92(6). 1369–1377. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29885>
- Wattana, M., Bey, T. (2009).** Mustard Gas or Sulfur Mustard: An Old Chemical Agent as a New Terrorist Threat. *Prehospital and Disaster Medicine.* 24(1). 19–29. <https://doi.org/10.1017/S1049023X0000649X>
- Wyman, C., Kanaar, R. (2006).** DNA Double-Strand Break Repair: All's Well that Ends Well. *Annual Review of Genetics.* 40(1). 363–383. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090451>
- Yue, L., Zhang, Y., Chen, J., Zhao, Z., Liu, Q., Wu, R., Guo, L., He, J., Zhao, J., Xie, J., Peng, S. (2015).** Distribution of DNA adducts and corresponding tissue damage of Sprague-Dawley rats with percutaneous exposure to sulfur mustard. *Chem Res Toxicol.* 28(3). 532–540. <https://doi.org/10.1021/tx5004886>
- Zhang, H., Chen, Y., Pei, Z., Gao, H., Shi, W., Sun, M., Xu, Q., Zhao, J., Meng, W., Xiao, K. (2019).** Protective effects of polydatin against sulfur mustard-induced hepatic injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 367. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.013>

ELEKTRONICKÉ ZDROJE

Annen N. STATEMENT BY NIELS ANNEN MINISTER OF STATE AT THE FEDERAL FOREIGN OFFICE OF GERMANY AT THE FOURTH SPECIAL SESSION OF THE CONFERENCE OF THE STATES PARTIES. In: *OPCW*. 2018. Dostupné na URL: <https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/2018/07/css4nat09%28e%29.pdf>. Přístup 17. 1. 2020

BBC. Woodhall Spa mustard gas clean-up 'will cost £100,000'. In: *BBC*. 2018. Dostupné na URL: <https://www.bbc.com/news/uk-england-lincolnshire-44138953>. Přístup 20. 8. 2020

Briggs J. How Mustard Gas Works. In: *HowStuffWorks*. 2008. Dostupné na URL: <https://science.howstuffworks.com/mustard-gas.htm#pt2>. Přístup 14. 1. 2020

Colorado Public Radio Staff and The Associated Press. Pueblo Chemical Depot Milestone: Quarter Of Old Mustard Gas Weapons Destroyed. In: *CPR News*. 2019. Dostupné na URL: <https://www.cpr.org/2019/04/03/pueblo-chemical-depot-milestone-quarter-of-old-mustard-gas-weapons-destroyed/>. Přístup 16. 1. 2020

Dean M. E. The mustard gas experiments done by the British Homoeopathic Society for the Ministry of Home Security, 1941-42. In: *JLL Bulletin: Commentaries on the history of treatment evaluation*. 2014. Dostupné na URL: <https://www.jameslindlibrary.org/articles/the-mustard-gas-experiments-done-by-the-british-homoeopathic-society-for-the-ministry-of-home-security-1941-42/>. Přístup 20. 8. 2020

Dickerson C. The VA's Broken Promise To Thousands Of Vets Exposed To Mustard Gas. In: *NPR*. 2015. Dostupné na URL: <https://www.npr.org/2015/06/23/416408655/the-vas-broken-promise-to-thousands-of-vets-exposed-to-mustard-gas?t=1597072210079&t=1597938343018>. Přístup 20. 8. 2020

Chivers C. J. A Veteran's Chemical Burns Expanded Military Doctors' Knowledge, but His Care Faltered. In: *The New York Times*. 2014. Dostupné na URL: <https://www.nytimes.com/2014/12/31/us/veterans-chemical-burns-expanded-military-doctors-knowledge-but-his-care-faltered.html>. Přístup 24. 2. 2020.

Johnston WM. R. Summary of historical attacks using chemical or biological weapons. In: *Johnston's Archive*. 2017. Dostupné na URL: <http://www.johnstonsarchive.net/terrorism/chembioattacks.html>. Přístup 14. 1. 2020

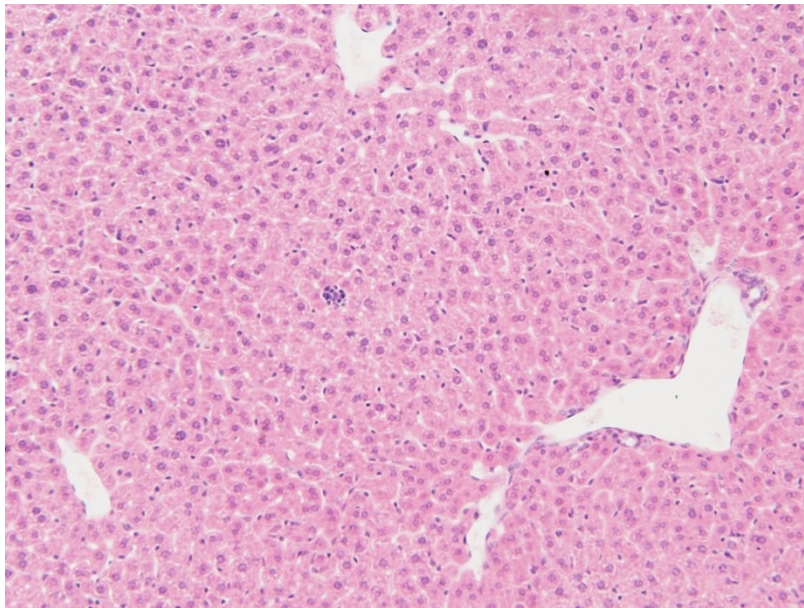
Kospertová L. Jedy na dně oceánů: Lidstvo straší už celé století! In: *EpochaPlus*. 2017. Dostupné na URL: <https://epochaplus.cz/jedy-na-dne-oceanu-lidstvo-strasi-uz-cele-stoleti/>. Přístup 15. 1. 2020

OPCW. General Obligations. In: *OPCW*. 2020. Dostupné na URL: <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/articles/article-i>. Přístup 20. 8. 2020

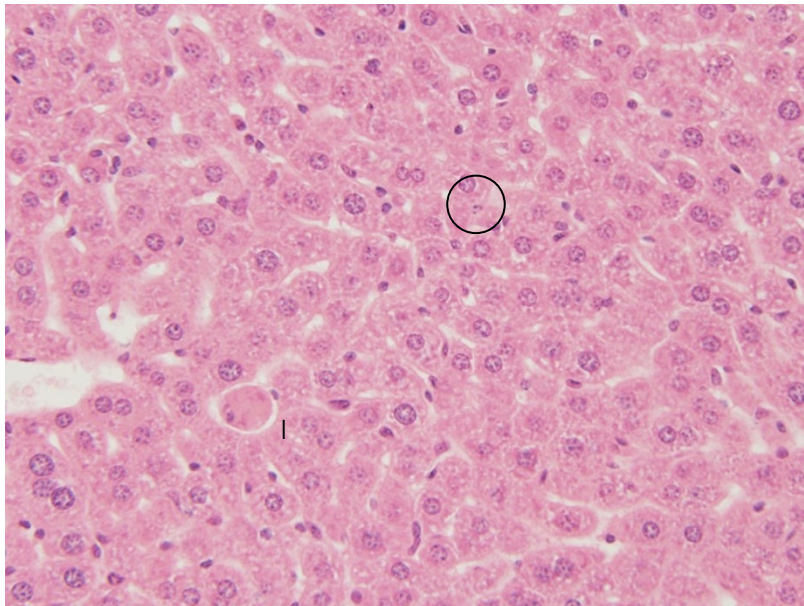
Overbeek E. Časovaná bomba v Severním moři. In: *VoxEurop*. 2011. Dostupné na URL: <https://voxeurop.eu/cs/content/article/1177441-casovana-bomba-v-severnim-mori>. Přístup 15. 1. 2020

Scott S. Weren't Syria's Chemical Weapons Destroyed? It's Complicated. In: *The New York Times*. 2017. Dostupné na URL: Přístup 17. 1. 2020

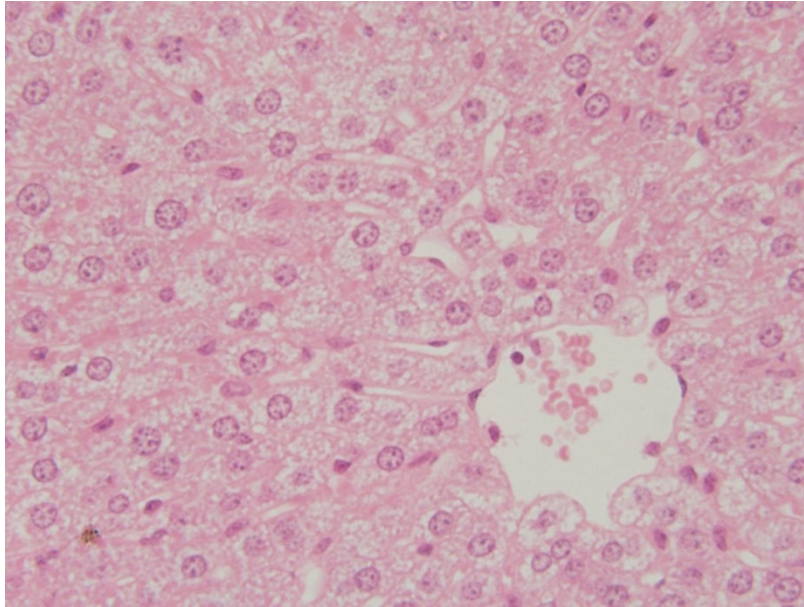
11 PŘÍLOHY



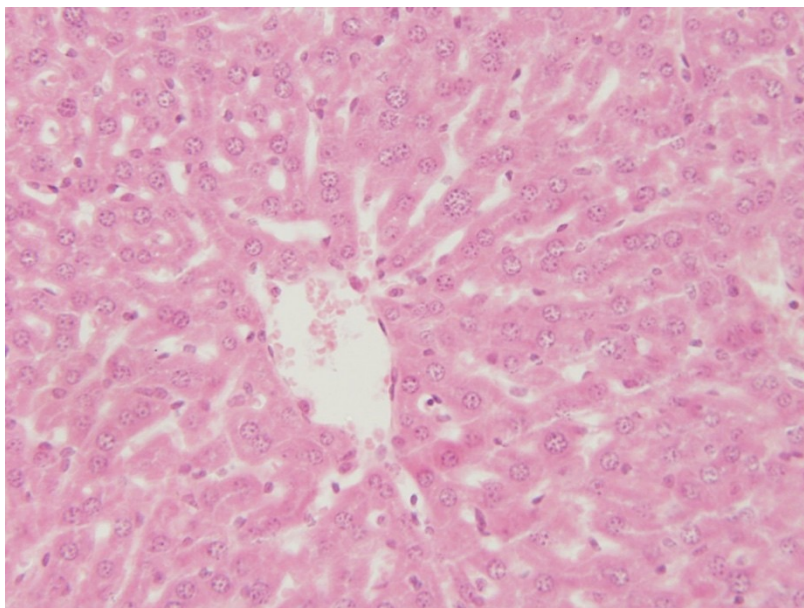
Příloha 1 Vzorek jaterní tkáně myši z kontrolní skupiny při 100násobném zvětšení s negativním histopatologickým nálezem. Na obrázku je patrný ostrůvek hematopoetické tkáně. Jedná se o nález charakteristický pro velmi mladé jedince.



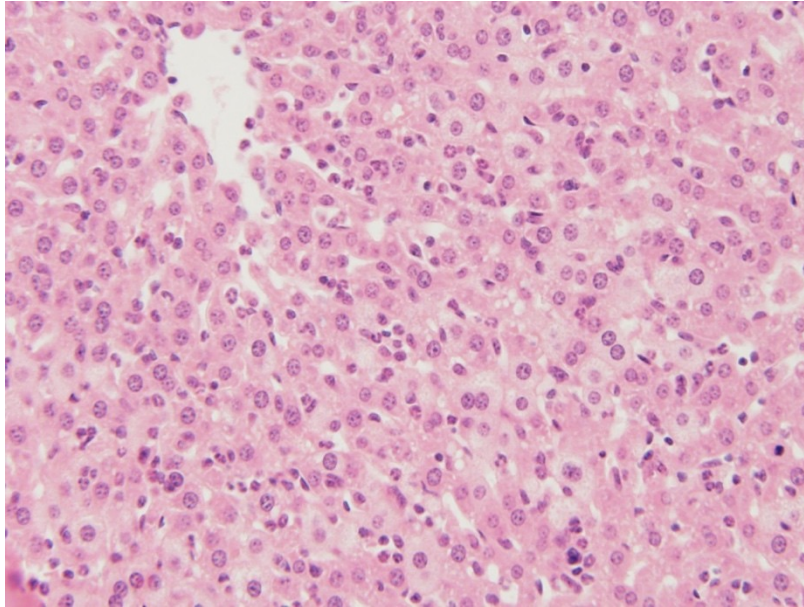
Příloha 2 Vzorek jaterní tkáně myši 3. den po intoxikaci yperitem v dávce 150 % při 200násobném zvětšení. Na obrázku je patrná zakulacující se apoptotická buňka s kondenzujícím se jádrem (šipka) a fagocytovaná apoptotická tělíška další apoptotické buňky (v kruhu).



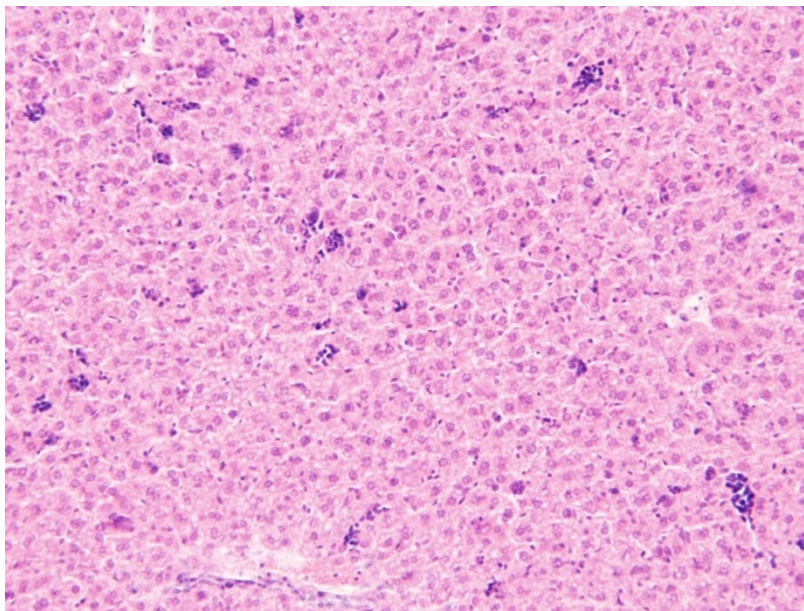
Příloha 3 Vzorek jaterní tkáně myši 5. den po intoxikaci yperitem v dávce 100 % při 400násobném zvětšení. Na obrázku převažují mikrovesikulární degenerativní změny.



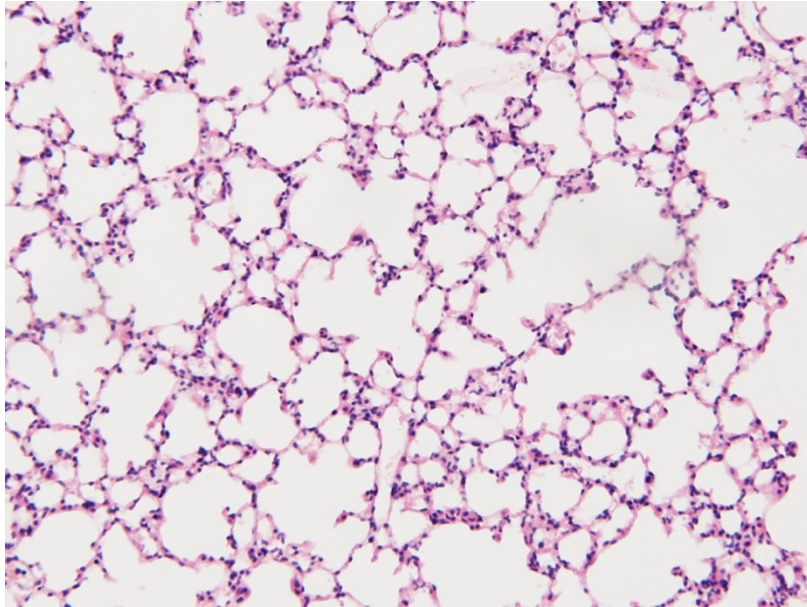
Příloha 4 Vzorek jaterní tkáně myši 5. den po intoxikaci yperitem v dávce 150 % při 200násobném zvětšení. Hepatocyty jsou poznamenány atrofickými změnami, které sekundárně rozšiřují sinusoidální prostory.



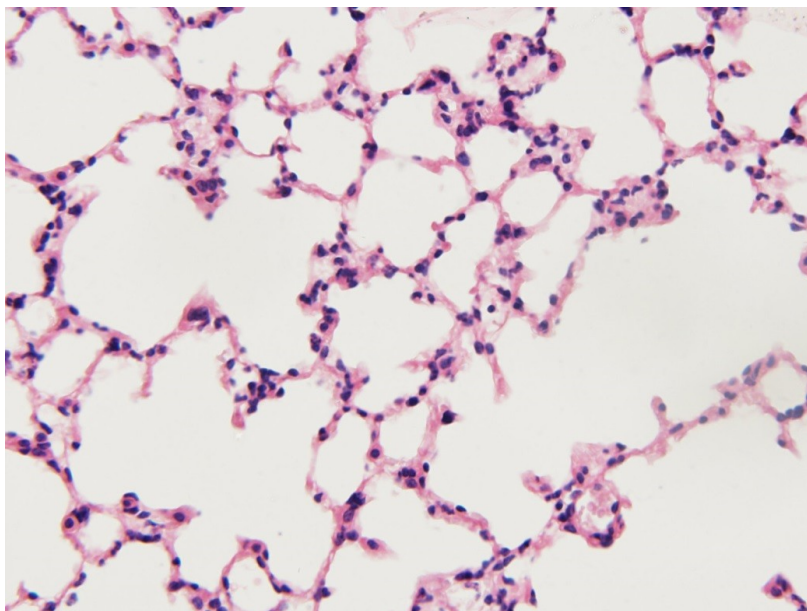
Příloha 5 Vzorek jaterní tkáně myši 7. den po intoxikaci yperitem v dávce 100 % při 200násobném zvětšení. Snímek je zaměřen na oblast infiltrovanou neutrofilními granulocyty se zvýšeným zastoupením apoptotických buněk.



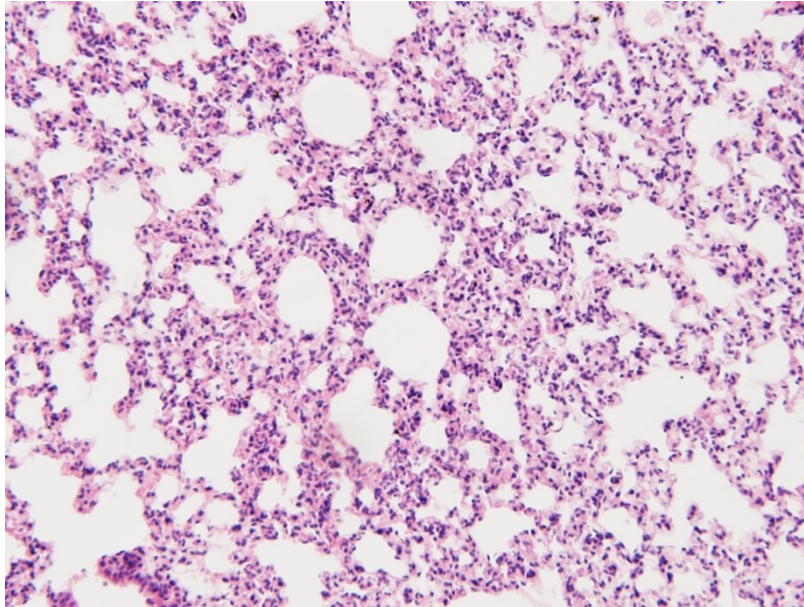
Příloha 6. Vzorek jaterní tkáně myši 7. den po intoxikaci yperitem v dávce 50 % při 100násobném zvětšení. Na obrázku jsou patrné četné hematopoetické ostrůvky.



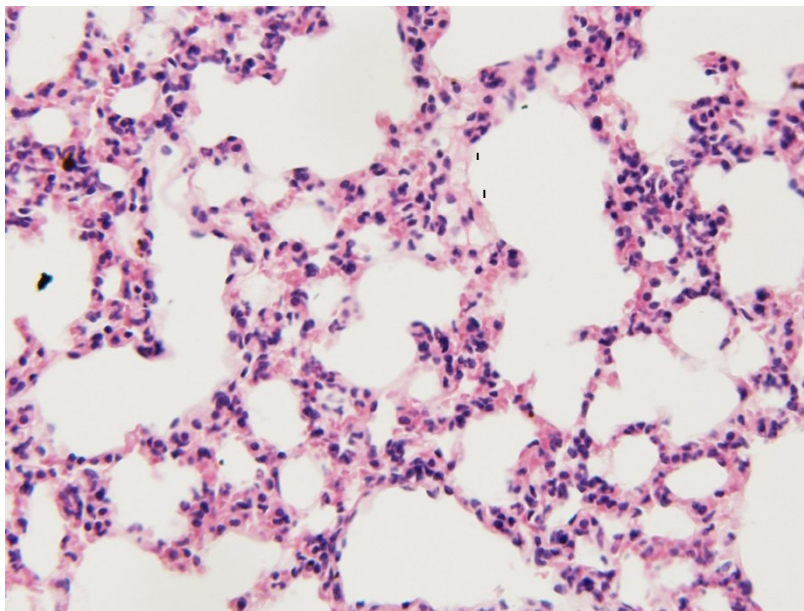
Příloha 7 Vzorek plicní tkáně myši z kontrolní skupiny při 200násobném zvětšení s negativním histopatologickým nálezem.



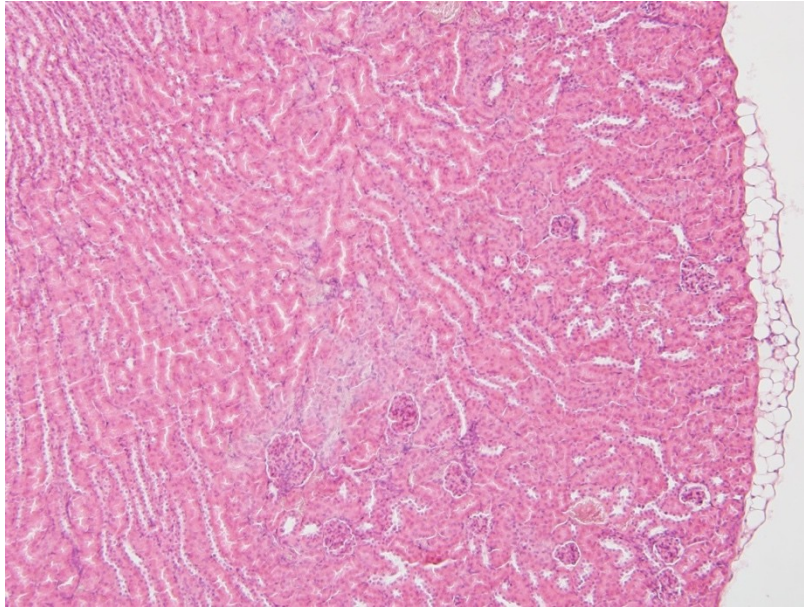
Příloha 8 Detail plicní tkáně kontrolního zvířete při 400násobném zvětšení bez histopatologického nálezu.



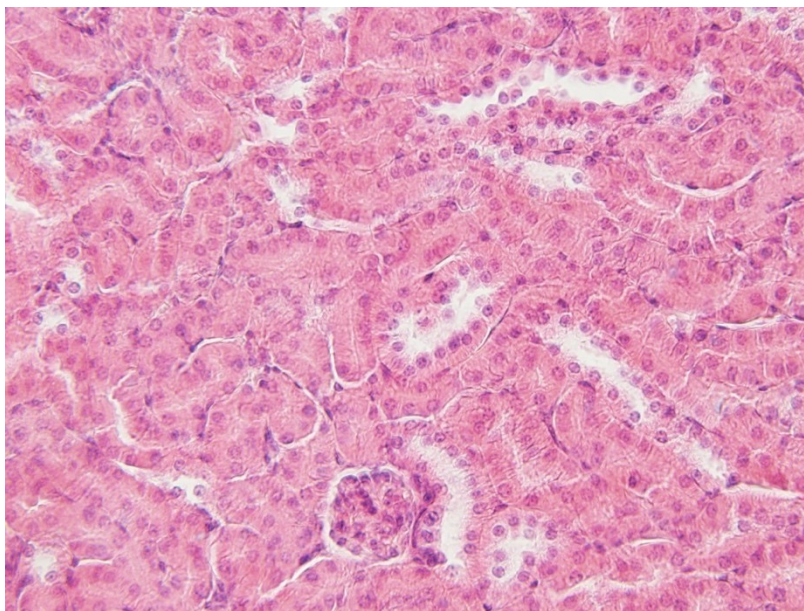
Příloha 9 Vzorek plicní tkáně myši 7. den po intoxikace yperitem v dávce 100 % LD₅₀ při 200násobném zvětšení. Na snímku je patrné rozšíření a zvýšená celularitu intersticia vedoucí k poklesu vzdušnosti plicní tkáně.



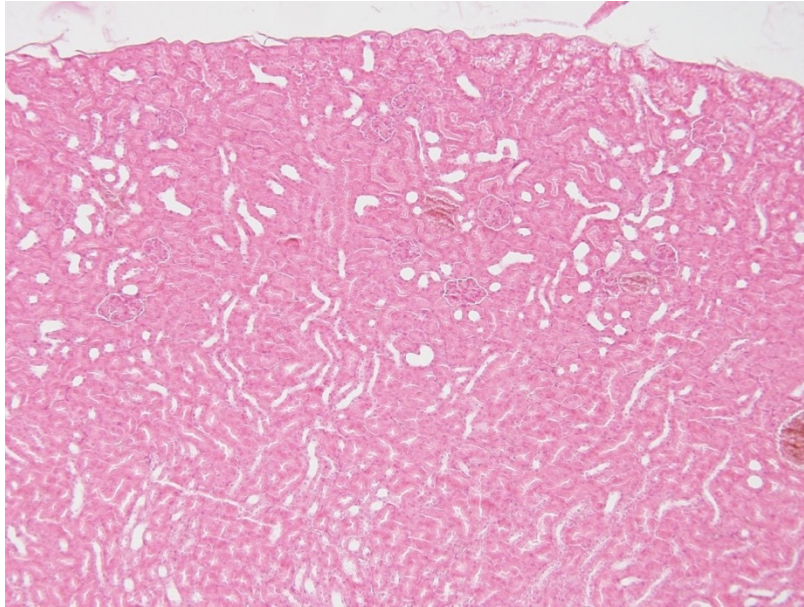
Příloha 10 Snímek plicní tkáně myši 7. den po intoxikace yperitem v dávce 100 % LD₅₀ při 400násobném zvětšení ukazující hyperémii, otok sept a jejich infiltraci neutrofilními granulocyty. Šipky indikují intraalveolární otok.



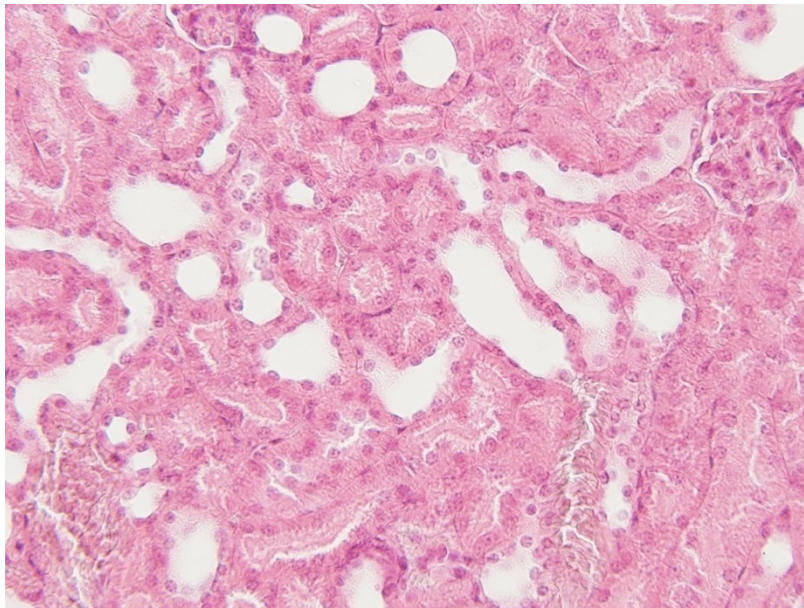
Příloha 11 Vzorek ledvin kontrolní myši při 100násobném zvětšení s negativním histopatologickým nálezem.



Příloha 12 Detail kůry ledvin kontrolního zvířete při 400násobném zvětšení.



Příloha 13 Vzorek ledvin myši 5. den po intoxikace yperitem v dávce 150 % LD₅₀ při 100násobném zvětšení. V kůře ledvin je patrná dilatace tubulů.



Příloha 14 Detail kůry ledvin myši 5. den po intoxikace yperitem v dávce 150 % LD₅₀ při 400násobném zvětšení. V dilatovaných tubulech je patrné mírné oploštění epitelu. Buňky přitom nevykazují jakékoliv degenerativní, apoptotické či nekrotické změny.