

7. SOUHRN

Bioscavengery jako profylaktika otrav organofosforovými inhibitory acetylcholinesterasy

Nervově paralytické látky (tabun, soman, sarin, VX) a pesticidy (parathion, malathion, chlorpyrifos) jsou vysoce toxické organofosforové sloučeniny, které ireverzibilně inhibují enzym AChE. Inhibovaná AChE nemůže plnit svou fyziologickou funkci – štěpení neuromediátoru acetylcholinu. Následné nahromadění acetylcholinu na cholinergních synapsích způsobuje cholinergní krizi, která může skončit až smrtí intoxikovaného organismu. Současný přístup k profylaxi otrav OFI spočívá v podávání reverzibilních inhibitorů AChE (pyridostigmin), centrálně působících anticholinergik (benaktyzin, trihexyfenidyl) a reaktivátorů AChE (HI-6). Přípravky s obsahem uvedených látek jsou zavedeny v armádách některých států, včetně AČR. Terapie otrav je založena na aplikaci anticholinergik (atropin), reaktivátorů AChE (obidoxim, methoxim, HI-6) a antikonvulziv (diazepam). Všechna tato antidota mohou chránit před smrtí následkem otravy organofosfáty, nezabrání ale následné paralýze po expozici, křečím a poruchám až trvalému poškození činnosti mozku. Relativně nový přístup k profylaxi a léčbě otrav OFI je použití určitých enzymů jako bioscavengerů. Bioscavengery mají schopnost účinně neutralizovat toxické OF v krevním oběhu ještě předtím, než dosáhnou svých přirozených cílů (synaptická AChE) a způsobí intoxikaci. Pro tyto účely jsou intenzivně studovány katalytické (fosfotriesterasa, paraoxonasa), stechiometrické (AChE, BuChE) a také pseudokatalytické (kombinace cholinesterasy a oximového reaktivátoru) bioscavengery.

V naší práci jsme se zabývali přípravou modifikované rekombinantní PTE, která by sloužila jako katalytický bioscavenger. PTE je enzym bakteriálního původu a její nevýhodou je krátký poločas v krevním oběhu a navození imunitní odpovědi po opakovaném podání. Jednou z možností jak obejít tyto problémy je modifikace enzymového bioscavengeru konjugací s vhodným biokompatibilním polymerem na bázi polyethylenglykolu (pegylace), což může zlepšit jeho stabilitu v krevním oběhu a imunitoleranci díky snížené schopnosti imunitního systému rozpoznávat takto upravený enzym. Podařilo se nám připravit PTE modifikovanou pomocí MPEG, optimalizovat postup modifikace a porovnat vlastnosti modifikované PTE s nativní PTE *in vitro* a následně *in vivo*. Ukázalo se, že modifikovaný enzym měl výrazně vyšší stabilitu a delší poločas v krevním oběhu potkana.

Dále jsme se v naší práci zabývali návrhem a testováním pseudokatalytického bioscavengeru, který by se skládal z cholinesterasy (AChE nebo BuChE) a vhodného oximového reaktivátoru. Oxim by měl mít co nejširší spektrum účinku (schopnost reaktivovat AChE nebo BuChE inhibovanou rozdílnými OF). Při našich experimentech jsme zjistili, že nejúčinnější reaktivátory cholinesteras mají několik společných strukturních rysů: jsou biskvarterní, s jednou nebo dvěma oximovými skupinami v poloze para (4) na pyridinovém kruhu a délkou spojovacího řetězce mezi 3-4 členy. BuChE inhibovaná OFI byla velmi obtížně reaktivovatelná a hodnoty reaktivace byly na rozdíl od AChE velmi nízké. Testované oximy proto nejsou vhodné jako součást pseudokatalytického bioscavengeru v kombinaci s BuChE, výsledky však mohou být použity při hledání struktur nových účinných reaktivátorů.