

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie

SLEDOVÁNÍ DISTRIBUCE REAKTIVÁTORŮ
ACETYLCHOLINESTERASY
PO INTRAMUSKULÁRNÍM PODÁNÍ

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Školitel – specialista: PharmDr. Jana Žďárová Karasová, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Daniela Hnídková

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem a že jsem ji vypracovala samostatně pod vedením školitele specialisty PharmDr. Jany Žďárové Karasové, Ph.D. a vedoucí práce PharmDr. Marie Vopršalové, CSc. a všechny použité prameny a literaturu jsem uvedla v seznamu literatury.

V Hradci Králové dne

.....

podpis autora

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla především poděkovat své školitelce PharmDr. Marii Vopršalové, CSc. za odborné vedení diplomové práce. Za neocenitelné rady, trpělivost a všestrannou pomoc při zvládnutí metodiky a vypracování diplomové práce PharmDr. Janě Žďárové Karasové, Ph.D. Taktéž děkuji za finanční podporu Grantové agentury Ministerstva zdravotnictví (grant č. NS/9747-3) a Ministerstvu obrany (grant č. OVUOFVZ200811). Děkuji všem, kteří jakkoliv přispěli k dokončení této práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Daniela Hnídková

Školitel: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Název diplomové práce: Sledování distribuce reaktivátorů acetylcholinesterasy
po intramuskulárním podání

Nervově paralytické látky (NPL) patří mezi organofosfátové inhibitory (OFI), které se ireverzibilně váží na acetylcholinesterasu (AChE). Neurotransmitter acetylcholin (ACh) není tedy rozkládán a jeho zvýšená koncentrace poté způsobuje nadměrné dráždění cholinergních receptorů, tzv. akutní cholinergní krizi (Patočka et al., 2004). Reaktivátory AChE, též nazývané oximy, jsou kauzálními antidoty při terapii intoxikací OFI a tedy i nervově paralytickými látkami. Jejich úkolem je vyvázat inhibitor z aktivního místa enzymu AChE a zabránit tak vzniku kovalentní vazby (Šepsová, 2010).

V této studii byla sledována farmakokinetika pěti vybraných reaktivátorů AChE (oxim HI-6, obidoxim, trimedoxim, oxim K203 a oxim K027), konkrétně jejich distribuce v organismu. K této studii byl použit jako modelový organismus potkan (samec, kmen Wistar).

Jako nejvhodnější separační metodika ke sledování jejich farmakokinetiky byla zvolena vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography; HPLC). V rámci studie bylo nezbytné správně stanovit mobilní fázi (složení, pH) – jako optimální se jevila mobilní fáze skládající se z 24% acetonitrilu a 76% destilované a deionizované vody obsahující 5 mM sodnou sůl oktansulfonové kyseliny a 5 mM tetramethylamonium chloridu. Přídavkem kyseliny fosforečné bylo upraveno pH na hodnotu 2,3. Nutné také bylo zvolit vhodné precipitační činidlo k odstranění proteinů ze vzorků, které by bylo kompatibilní s mobilní fází, tím byl acetonitril.

Distribuce jednotlivých reaktivátorů AChE byla stanovena u skupin ($n = 7$) vybraných zvířat. Výsledné hodnoty pro jednotlivá stanovení koncentrace v odpovídajícím časovém intervalu byly průměrnou hodnotou ze 3 měření. Vzhledem k rychlosti inhibice AChE při intoxikaci NPL je žádoucí, aby distribuce léčiv probíhala co nejrychleji. Nejlepší výsledky tak vykazoval obidoxim (maximální koncentrace $23,60 \pm 1,35 \mu\text{g/ml}$ dosahoval již

v 10. minutě), za ním následovali trimedoxim (maximální koncentrace $16,60 \pm 2,68$ $\mu\text{g/ml}$ ve 20. minutě), oxim HI-6 (maximální koncentrace $15,30 \pm 0,65$ $\mu\text{g/ml}$ ve 40. minutě), oxim K027 (maximální koncentrace $17,60 \pm 0,62$ $\mu\text{g/ml}$ ve 40. minutě) a oxim K203 (maximální koncentrace $16,60 \pm 2,00$ $\mu\text{g/ml}$ v 60. minutě). Nalezené rozdíly v distribuci pak byly hodnoceny a byly využity k pochopení vztahu struktura léčiva – její farmakokinetický profil.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Daniela Hnídková

Supervisor: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Title of diploma thesis: The monitoring of acetylcholinesterase reactivators distribution after intramuscular administration.

Nerve agents belong to the group of OFI that irreversibly binds to acetylcholinesterase (AChE). Neurotransmitter acetylcholine (ACh) cannot be degraded and its increased concentration causes excessive overstimulation of cholinergic receptors, known as acute cholinergic crisis (Patočka et al., 2004). Reactivators of acetylcholinesterase, also called oximes, are causal antidotes for the treatment of OFI poisonings and therefore nerve agents. Their mechanism of action is to break bond between inhibitor and AChE active site and prevent its subsequent covalent binding (Šepsová, 2010).

In this study pharmacokinetics of five selected reactivators of AChE (oxime HI-6, obidoxime, trimedoxime, oxime K203 and oxime K027) were monitored. Rats were used as a convenient model organism (male, tribe Wistar) for presented *in vivo* study.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was selected as the most suitable separation method to studied pharmacokinetics of oximes. In this study it was necessary to determine convenient mobile phase (its composition, pH). As the optimal mobile phase was used mobile phase consisting of 24% acetonitrile and 76% distilled and deionized water, containing 5 mM sodium octansulfonate and 5 mM tetramethylammonium chloride. pH was adjusted to 2.3 by phosphoric acid addition.

Distribution of AChE reactivators was determined in groups ($n = 7$) of selected animals. The result for the individual determination of concentration in the corresponding time interval was the average value of three measurements. Due to the high rate of AChE inhibition by nerve agents it is clear that the distribution of therapeutics should be really quick. The best results were showed after obidoxime application (maximum concentration 23.60 ± 1.35 $\mu\text{g/ml}$, reached in the 10th minute), followed by trimedoxime (the maximum concentration of 16.60 ± 2.68 $\mu\text{g/ml}$ in the 20th minute), oxime HI-6 (maximum

concentration of 15.30 ± 0.65 $\mu\text{g/ml}$ in the 40th minute), oxime K027 (maximum concentration of 17.60 ± 0.62 $\mu\text{g/ml}$ in the 40th minute) and lastly oxime K203 (maximum concentration of 16.60 ± 2.00 $\mu\text{g/ml}$ in the 60th minute). Differences in pharmacokinetics profile of tested oxime should be explained by changes in their structures. These differences can help us to understand possible relationship between oxime structure and its therapeutic efficacy.

OBSAH

1.	ÚVOD	10
2.	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1.	Organofosforové inhibitory	11
2.2.	Historie.....	12
2.2.1.	Objev látek G	12
2.2.2.	Objev látek V	12
2.2.3.	Dědictví minulosti.....	13
2.3.	Klasifikace bojových chemických látek	14
2.3.1.	Všeobecně jedovaté látky	14
2.3.2.	Dusivé látky	14
2.3.3.	Zpuchýřující látky	15
2.3.4.	Dráždivé látky	15
2.3.5.	Psychoaktivní látky	15
2.3.6.	Nervově – paralytické látky	15
2.3.6.1.	Struktury NPL.....	16
2.3.6.2.	Mechanismus působení NPL	17
2.3.6.3.	Příznaky otrav NPL	18
2.3.6.4.	Komplikace otravy NPL	19
2.3.6.5.	Terapie intoxikací	20
2.4.	Farmakokinetika reaktivátorů AChE	23
2.5.	Mechanismus účinku reaktivátorů AChE	23
2.6.	Sledování distribuce reaktivátorů AChE	24
2.6.1.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	25
2.6.1.1.	Instrumentace HPLC.....	25
2.6.1.2.	Kvalitativní a kvantitativní analýza HPLC chromatografu	26
2.6.2.	Gelově permeační chromatografie.....	26
2.6.3.	Rozdělovací chromatografie	26
2.6.4.	Iontově výměnná chromatografie	26
2.7.	Modifikace separačního modelu pro stanovení oximů v biologickém vzorku.....	27
3.	CÍL PRÁCE	29
4.	METODIKA	30
4.1.	Reagencie a chemikálie	30
4.2.	HPLC systém	30
4.3.	Podmínky separace	30
4.4.	<i>In vivo</i> studie	32
4.5.	Úprava vzorků.....	34
4.6.	Kalibrace	35
4.7.	Kalibrační křivky	35
4.8.	Limity kvantifikace a Limity detekce	37
5.	VÝSLEDKY	39
5.1.	Oxim HI-6.....	40
5.2.	Obidoxim	41
5.3.	Trimedoxim	42
5.4.	Oxim K027	43
5.5.	Oxim K203	44
6.	DISKUZE	45

7.	ZÁVĚR	50
8.	SEZNAM ZKRATEK	51
9.	SEZNAM LITERATURY	52

1. ÚVOD

Reaktivátory acetylcholinesterasy (AChE; EC 3.1.1.7) jsou sloučeniny, jejichž primární úkol spočívá v obnově zablokovaného enzymu (AChE), čímž mu navrácí jeho funkci degradovat acetylcholin (ACh) na cholin a kyselinu octovou. ACh je důležitým neurotransmiterem v centrálním nervovém systému (CNS), dále je také hlavním neurotransmiterem parasympatiku, který umožňuje přenos nervového vzruchu ve vegetativních gangliích a na nervosvalové ploténce. AChE se tak vyskytuje především v cholinergních neuronech a ve velkém množství právě na nervosvalové ploténce.

Látky, které blokují funkci tohoto enzymu, jsou nazývány inhibitory AChE – z řad léčiv se jedná o krátkodobé, reverzibilní inhibitory (Pyridostigmin, Physostigmin) a je jich využito zejména v terapii Alzheimerovy choroby, k léčbě myasthenia gravis aj. Z řad toxikologicky významných sloučenin jde o reverzibilní inhibitory AChE – v zemědělství používané jako pesticidy, herbicidy a insekticidy (parathion, malathion aj.) nebo ireverzibilní inhibitory jako jsou např. chemické bojové látky (sarin, soman, tabun, látka VX).

V terapii intoxikací těmito noxami jsou užívány tzv. reaktivátory AChE. Podle své chemické struktury jsou reaktivátory AChE též nazývány oximy – typická je přítomnost jedné či více oximových skupin, navíc ve své molekule všechny obsahují jeden nebo dva kvarterní dusíky (jedno nebo dvě pyridinová jádra), což je příčinou toho, že prakticky neprostupují do CNS a působí převážně na periferii. Tato jádra, pokud jde o biskvarterní sloučeninu, jsou spojena řetězcem – jednotlivé oximy se od sebe liší jeho délkou či substituenty a dále se liší i substitucí na pyridinovém jádře.

OFI mají k reaktivátorům větší afinitu než k AChE; oximová skupina je vysoce nukleofilní, reaguje s OFI v kavitě enzymu, vzniká komplex oxim – organofosfát a AChE se uvolňuje. Oximy musí být podány co nejdříve po intoxikaci, protože jakmile komplex AChE – organofosfát „zestárne“, nejsou oximy schopné enzym reaktivovat (Lincová, Farghali et al., 2007).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Organofosforové inhibitory

Organofosforové sloučeniny jsou látky, které jsou používány v zemědělství jako pesticidy (paraoxon, parathion, malathion) nebo ve vojenství jako chemické bojové látky (nervově paralytické látky; NPL).

Podle zprávy OSN z roku 1969 je chemická zbraň charakterizovaná jako „chemická substance, ať už plynná, kapalná nebo pevná, jejíž jedovaté účinky by mohly být zneužity proti člověku, zvířatům nebo rostlinám“. Úmluva o zákazu vývoje, výroby, skladování a použití chemických zbraní (CWC, Chemical Weapons Convention) doplňuje, že chemické zbraně (CHZ) jsou nejen vlastní jedovaté chemikálie, ale i munice a vybavení pro jejich rozšiřování (Visingr, Sedláček, 2004). Jedná se o první multilaterální odzbrojovací dohodu poskytující možnost pro eliminaci jedné kategorie zbraní hromadného ničení pod všeobecně používanou mezinárodní kontrolou (Středa et al., 1999).

Jejich základní vlastností je vysoká toxicita, zejména novodobých nervově paralytických látek, u nichž se smrtelné dávky pro člověka pohybují řádově 10^{-3} g (Visingr, Sedláček, 2004) a akutní otravy organofosforovými pesticidy způsobí desítky tisíc úmrtí ročně v rozvojových zemích (Buckley, 2011).

Nasazení CHZ se předpokládá na hromadné cíle, a proto jsou bojové otravné látky kvalifikovány též jako zbraně hromadného ničení (online 30. 3. 2011). CHZ jsou velmi obávaným prostředkem a představují hrozbu i pro ty nejvyspělejší armády světa (Visingr, Sedláček, 2004). S narůstající hrozbou terorismu je hrozba intoxikací těmito látkami poměrně vysoká (Patočka et al., 2004).

Mezi nejznámější zástupce NPL patří sarin (GB; *O*-isopropylmethylfluorofosfonát), soman (GD; *O*-pinakolylmethylfluorofosfonát), tabun (GA; *O*-ethylmethylamidokyanofosfát) a látka VX (*O*-ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl)-methylthiofosfonát) (Patočka et al., 2004).

2.2. Historie

2.2.1. Objev látek G

Nervově paralytické látky, byly objeveny v době před 2. světovou válkou při výzkumu pesticidů (prostředky určené k ničení škůdců), které mohly hrát důležitou roli při ochraně zásob potravin. Tento výzkum vedl k objevení toxických účinků organofosfátů a záhy se zjistilo, že mnohé z nich jsou jako pesticidy nepoužitelné, protože kromě škůdců jsou smrtelně nebezpečné i pro člověka. Toto však zaujalo vojenské velení a jejich intenzivní výzkum dále pokračoval, tentokrát ovšem už jako potenciálních chemických zbraní (Visingr, Sedláček, 2004).

Historie těchto látek se začala psát v závodech koncernu IG Farben. V laboratořích této firmy pracovala skupina vedená Gerhardem Schraderem. Jejím prvotním cílem bylo nalezení účinných insekticidů mezi estery kyselin fosforu. Po úspěšné syntéze řady vysoce toxických látek, nejen pro hmyz, projevíli o tento výzkum zájem vojenští odborníci, kteří později změnil cíleně jeho orientaci (Cabal, Bajgar, 1999). Tým G. Schradera v roce 1936 připravil první sloučeninu z tzv. skupiny látek G („klasické“ nervově paralytické látky). Dostala název tabun (kód GA) a mezi roky 1942 a 1945 se jí údajně vyrobilo 30 000 tun (Visingr, Sedláček, 2004).

Jako v pořadí druhá látka G (1938) byl objeven sarin (kód GB), jehož název je zkratkou jmen jeho tvůrců (Schrader, Ambros, Ritter a Linde). Je jedinou NPL, která byla skutečně prokazatelně použita v boji; od roku 1985 jej zneužíval Irák proti Iránu (Visingr, Sedláček, 2004).

2.2.2. Objev látek V

Vojensko-politický vývoj v poválečné Evropě přál dalšímu výzkumu na poli nových otravných látek, a tak k látkám objeveným Schraderovým týmem přibývaly další. Byla to například řada tzv. Tammelinových esterů, jejichž vývoj završily USA zavedením látky VX do výzbroje a ještě později zavedením látky IVA (intermediate volatility agent - látka se střední těkavostí) (Cabal, Bajgar, 1999). Hlavním představitelem skupiny V je tedy látka VX. Jde o jednu z nejjedovatějších nervově paralytických látek (je přibližně stokrát toxicitější než sarin). Byla objevena v roce 1952 ve známém britském středisku výzkumu chemických zbraní v Porton Down a údaje o ní byly předány Spojeným státům výměnou za tajemství termonukleární bomby. Látka VX se později stala základem chemického arzenálu USA. Ale ani poté výzkum NPL neskončil; příkladem je dosud tajemný paralytický plyn

Novičok, který byl údajně vynalezen v bývalém SSSR a který by měl být až osmkrát účinnější než VX (Visingr, Sedláček, 2004).

2.2.3. Dědictví minulosti

Historie OFI se začala psát před více než 150 lety. Za tuto dobu byly objeveny jejich insekticidní vlastnosti, objasněn mechanismus toxického účinku, ale zejména byly objeveny látky s vojenským využitím jako chemických zbraní, které rozhodujícím způsobem změnily pohled na vedení války (Patočka, 2010).

Válečným konfliktem, v němž byly chemické látky poprvé použity k vojenským účelům jako CHZ, byla 1. světová válka. Na bojištích byly použity látky smrtící a v různé míře látky dráždivé. Nejnebezpečnějšími z nich byly chlór, fosgen, kyanovodík a yperit (Bajgar, Fusek, 2006).

Faktem ovšem je, že vojenský význam chemických zbraní v současnosti klesá. Naopak stále větší obavy vzbuzuje použití chemických zbraní teroristy (Visingr, Sedláček, 2004).

Dalším nebezpečím jsou existující zásoby chemických zbraní. Přestože USA doufaly, že své zásoby zlikvidují během 90. let, proces stále není u konce. Další hrozbu představují zásoby zbraní, které byly po druhé světové válce uloženy na dno Baltského moře. Podle odhadů jde o desítky až stovky tisíc tun nádrží a munice obsahujících yperit, tabun a nechvalně známý Cyklon B (Visingr, Sedláček, 2004).

Likvidace chemických zbraní stále pokračuje. Vyspělé země totiž chápou, jaké nebezpečí chemické zbraně představují v rukou teroristů, diktátorských režimů nebo nestabilních vlád třetího světa (Visingr, Sedláček, 2004).

2.3. Klasifikace bojových chemických látek

Otravné látky (OL) tvoří základní účinnou složku chemických zbraní. Do organismu pronikají dýchacími orgány, nepoškozenou pokožkou, ranami způsobenými střepinami chemické munice, sliznicí nosohltanu, očima nebo požitím kontaminované vody a potravin (online 6. 4. 2011a).

Při bojovém použití se nejčastěji používají ve formě par, aerosolů nebo kapek. OL ve formě par a vysoce disperzních aerosolů kontaminují vzduch a působí na živou sílu inhalačně (přes dýchací orgány). OL ve formě hrubě disperzních aerosolů nebo kapek kontaminují terén, bojovou techniku, výzbroj a výstroj, prostředky ochrany i vodní zdroje (online 6. 4. 2011a).

2.3.1. Všeobecně jedovaté látky

Kyanovodík (AC), Chlorkyan (CK)

Jedná se o velmi těkavé látky s nízkou stálostí v terénu. Tyto látky blokují tkáňové dýchání a v důsledku centrální obrny dýchání mohou způsobit i smrt (online 30. 3. 2011).

Hlavními příznaky otravy jsou bolesti hlavy, přechodné poruchy zraku, ztížené dýchání a zrychlená srdeční činnost. Při vysoké koncentraci par má otrava velmi rychlý průběh - smrt nastává do dvou až tří minut (online 30. 3. 2011).

2.3.2. Dusivé látky

Fosgen (CG); Difosgen (DP); Chlorpikrin (PS, KLOP)

Fosgen je bezbarvý plyn, difosgen a chlorpikrin jsou bezbarvé olejovité kapaliny. Dráždí hlavně respirační trakt (způsobují toxický otok plic, což znamená naplnění plic kapalinou), oči a ve vyšších koncentracích i kůži (online 30. 3. 2011).

Příznaky zasažení dusivými látkami jsou pocit škrábání v krku a dráždivý kašel, bolest hlavy, nevolnost až zvracení. Při velmi vysoké koncentraci dochází k superakutní otravě, což znamená okamžitou smrt zasaženého v důsledku reflexní zástavy dechu (online 30. 3. 2011).

2.3.3. Zpuchýřující látky

Sulfidický yperit (HD); Dusíkatý yperit (HN-3); Lewisit (L, M-1); Směs yperit – lewisit (HL)

Jedná se o olejovité nažloutlé kapaliny stálé v terénu. Do organismu pronikají všemi branami a na místě kontaktu vyvolávají morfologické změny ve tkáních, obvykle ireverzibilního charakteru - na kůži je to červené zbarvení, otok a do 24 hodin od zasažení první puchýře. Při průniku oční spojivkou vyvolávají pálení, slzení a řezání v očích a při větší koncentraci i zánět rohovky. V dýchacích cestách působí tyto látky pocit sucha a škrabání v krku, dráždivý kašel, chraptot až ztrátu hlasu (online 30. 3. 2011).

2.3.4. Dráždivé látky

chloracetofenon (CN); Látka CS (CS); Látka CR (CR)

Jedná se o bílé nebo nažloutlé krystalické látky bez zápachu, nebo s dráždivým zápachem po pepři (online 30. 3. 2011). Účelem jejich použití je snížit bojeschopnost protivníka, případně ztížit protivníkovi používání ochranné masky (Bajgar, 2007). Bezprostředně po jejich zasažení dochází k prudkému podráždění očních spojivek doprovázené slzením, nebo sliznice horních cest dýchacích, způsobující neovladatelný záchvat kašle (online 30. 3. 2011).

2.3.5. Psychoaktivní látky

Látka BZ (BZ); LSD (LSD-25)

Jedná se o bílé pevné látky bez zápachu. Slouží pouze k rozvrácení organizované činnosti lidí. U zdravého člověka vyvolávají bez větší poruchy vědomí změny ve sféře emoční a ve sféře vnímání. Postižení jsou neklidní, mají sníženou koordinaci pohybů, závratě a bolesti hlavy. Po odeznění této fáze pak nastupuje stadium letargie, ospalost až spánek, strnulost a únava (online 30. 3. 2011).

2.3.6. Nervově – paralytické látky

Sarin (GB, T-144); Soman (GD, VR-55); Látka VX (VX); Tabun (GA); Látka IVA(GV); Cyklosarin (GF)

Jedná se o bezbarvé až nahnědlé kapaliny velmi (sarin), nebo málo (VX) těkavé. Mají nepatrný ovocný, thiolový nebo vůbec žádný zápach. Svojí toxicitou převyšují ostatní známé OL. V organismu se projevují především v oblasti CNS. Vše končí obrnou až ochrnutím dýchacích svalů a kardiovaskulárním selháním (online 30. 3. 2011). Únava,

podrážděnost, nervozita a poruchy paměti mohou přetrvávat i 6 týdnů po zotavení z expozice NPL (online 3. 4. 2011).

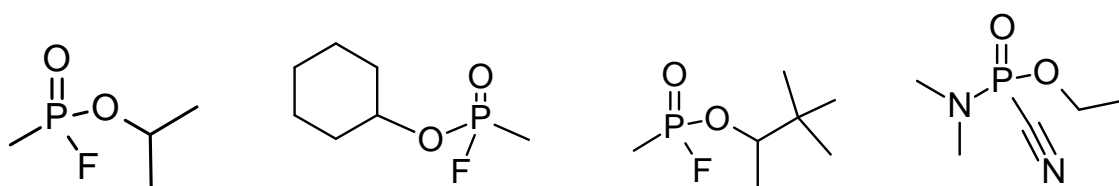
Po zasažení nervově paralytickými látkami je nutné ihned vstříknout do svalu na přední straně stehna (i přes oděv) antidotum (autoinjektory GAI, Combopen, Multipen aj.). Vstříknutí antidota je možné v prvních hodinách po intoxikaci opakovat. Dále je nutné provést ihned dekontaminaci kůže a oděvu (online 30. 3. 2011).

2.3.6.1. Struktury NPL

Z chemického hlediska jsou nervově paralytické látky estery fosfonových nebo fosforečných kyselin. Rozdělují se na dvě skupiny, které jsou obecně označovány jako G látky a V látky.

Mezi zástupce G látek patří: tabun (GA; *O*-ethyl dimethylamidokyanofosfát), sarin (GB; *O*-isopropylmethylfluorofosfonát), cyklosarin (GF; *O*-cyklohexylmethylfluorofosfonát) a soman (GD; *O*-pinakolylmethylfluorofosfonát).

Mezi látky V patří látka VX *O*-ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl)-methylthiofosfonát, která dosáhla největšího vojenského významu, a její izomery jako je ruská VX, čínská VX (obr. 1) (Newmark, 2007).



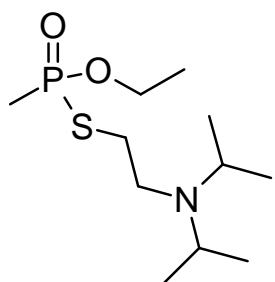
Sarin

Cyclosarin

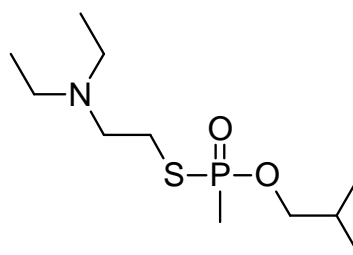
Soman

Tabun

Nervově - paralytické látky – G látky



Látka VX



Ruská VX

Nervově - paralytické látky – V látky

Obr. 1: Struktury NPL

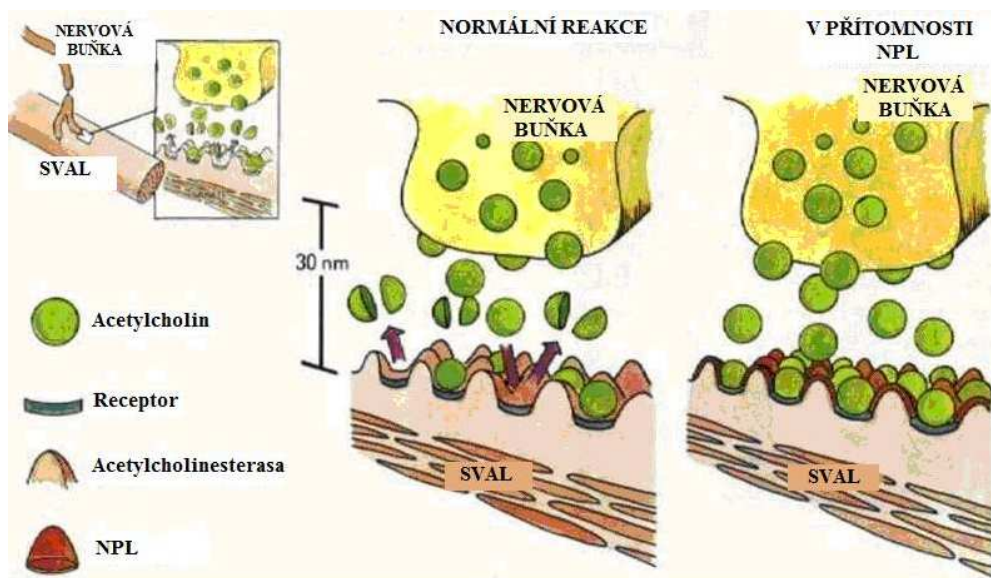
2.3.6.2. *Mechanismus působení NPL*

NPL, nejsmrtelnější z klasických chemických bojových látek, fungují především jako inhibitory AChE a způsobují tak rychle postupující cholinergní krizi (Newmark, 2004). Ovlivňují cholinergní přenos nervového vzruchu v důsledku inhibičního působení na cholinesterasy (Bajgar et al., 1991).

Fyziologickou funkcí AChE na cholinergních synapsích je štěpení neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) na cholin a kyselinu octovou. ACh působí jako přenašeč nervových vzruchů na cholinergních synapsích (inervace, žlázy, srdce, hladkého svalstva), gangliových buňkách, dřeni nadledvin, nervosvalových ploténkách a synapsích CNS (Bartosova et al., 2006). ACh je syntetizován z exogenně dodávaného cholinu (potrava), který je acetylován pomocí acetylkoenzymu A. Tuto reakci katalyzuje enzym cholinacetyltransferasa (ChAT, EC 2.3.1.6) (Bajgar et al., 1991).

Enzymatická hydrolýza ACh se uskutečňuje na aktivním centru AChE. Toto nejdůležitější místo AChE také označované jako tzv. katalytické centrum je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu (tzv. α - anionické místo). Dále se na aktivním povrchu AChE nachází ještě jedno anionické místo, označované jako β - anionické místo a v blízkosti esteratického místa ještě tzv. oblast hydrofobních interakcí, někdy označovaná jako γ - anionické místo (Bajgar et al., 1991).

OFI (NPL) jsou látky, které fosforylují či fosfonylují hydroxylovou skupinu serinu v esteratické části enzymu. Stabilní kovalentní konjugáty vzniklé inhibicí mohou být následně hydrolyzovány (spontánní reaktivace) nebo dealkylovány (stárnutí enzymu; aging). Protože spontánní reaktivace inhibovaného enzymu je pomalá a v případě rychlého stárnutí k ní dokonce prakticky nedochází, hovoříme o těchto látkách jako o ireverzibilních inhibitech AChE (Wiesner et al., 2005). Mezi tímto typem inhibitoru a enzymu se vytváří pevná kovalentní vazba. OFI je tím silnějším inhibitelem AChE, čím je nižší disociační konstanta k_d , tzn. čím je větší rychlost přeměny přechodného komplexu enzym – inhibitor na fosforylovaný (inhibovaný) enzym. Tento komplex OFI a AChE (fosforylovaný enzym) se vodou hydrolyzuje velmi pomalu, a proto je AChE pro normální funkci zablokována. Na cholinergních synapsích, kde je vzruch přenášen ACh, dojde k jeho nahromadění a tedy v podstatě k endogenní intoxikaci tímto neurotransmiterem (obr. 2) (Bajgar et al., 1991).



Obr. 2: Mechanismus působení NPL

2.3.6.3. Příznaky otrav NPL

V případě akutní otravy NPL jsou typické příznaky způsobené nadměrnou stimulací cholinergních receptorů vegetativního nervového systému na postsynaptické membráně (tento stav je označován také jako akutní cholinergní krize) (online 1. 4. 2011). Schematicky je možno symptomy intoxikace rozdělit na příznaky muskarinové, nikotinové a centrální. V závislosti na stupni intoxikace mohou být tyto příznaky vyjádřeny v různé míře (Bajgar et al., 1991).

Z patofyziologického hlediska je možno při intoxikaci OFI rozlišit několik fází. První zahrnuje vstup OFI do organismu, průnik do krevního oběhu a následně biologickými bariérami, transport noxy na místo metabolizace a toxického efektu a zde interakci s příslušnými enzymatickými systémy. Druhá fáze je charakterizována hromaděním ACh na nervových zakončeních a projevy jeho zvýšené koncentrace v těchto místech. Třetí stádium je charakterizováno řadou biochemických a patofyziologických změn v důsledku přímého účinku ACh na receptorech, buněčných membránách. Poslední fáze, která je pozorována jen u některých OFI, je charakterizována projevy pozdní neurotoxicky (Bajgar, 1985).

Klinickým projevem prvních dvou fází jsou příznaky muskarinového typu, dané akumulací ACh na synapsích vegetativního systému, příznaky nikotinové, dané hromaděním ACh na neuromuskulárních ploténkách a motorických nervů, a centrální, dané nerovnováhou mezi cholinergním přenosem nervového vzruchu a ostatními neuromediátorovými systémy v CNS (Bajgar, 1985).

- a) *Muskarinové příznaky* se projevují na zornicích – mióza, ciliárním svalu – poruchy akomodace, spojivkách a nosní sliznici – překrvení, na slinných, slzných a potních žlázách – zvýšené slinění, slzení a pocení, v dýchacích cestách – zvýšená sekrece, bronchokonstrikce, na hladké svalovině trávicího traktu a močového měchýře – zvýšená peristaltika, poruchy mikce a defekace. Na srdci je pozorována bradykardie, krevní tlak klesá (Bajgar, 1985).
- b) *Nikotinové příznaky* jsou charakterizovány svalovou ochablostí, fibrilacemi, nejprve jednotlivých svalů, pak i skupin, které přecházejí v tonicko – klonické křeče a později v parézu až paralýzu svalstva. Tyto příznaky vedou ke značnému omezení ventilace (křeče a později paralýza dýchacích svalů), která je prohlubována bronchokonstrikcí a zvýšenou bronchiální sekrecí (Bajgar, 1985).
- c) *Centrální příznaky* jsou charakterizovány bolestmi hlavy, úzkostí, emoční labilitou, napětím, neklidem, nesnadnou koncentrací, závratěmi, depresivními stavy, zmateností, ataxií a bezvědomím (Bajgar 1985).

Podle dávky a v závislosti na toxicitě použitého OFI se při perorální intoxikaci většinou nejprve vyvíjejí gastrointestinální příznaky (1 – 2 hodiny po požití), charakterizované jako bolesti břicha kolikovitého charakteru, s nevolností, která může přejít ve zvracení. Dalším subjektivním příznakem je svalová slabost, ztížené dýchání a zhoršené vidění. Objektivně je pozorována mióza, zvýšená střevní peristaltika, nepravidelné dýchání, pocení, zvýšená slzná a nosní sekrece, bradykardie, zvýšený svalový tonus až tonicko – klonické křeče a bezvědomí (Bajgar, 1985).

U inhalační formy intoxikace jsou v porovnání s intoxikací p.o. výrazněny příznaky ztíženého dýchání, více vyjádřena mióza, a trávicí obtíže nejsou tak výrazné. Také průběh otravy je rychlejší. Výrazné jsou příznaky centrální (Bajgar, 1985).

U perkutánního zasažení je naopak průběh otravy prodloužen, včetně doby latence, která může být 1 – 12 hodin. Mióza bývá nevýrazná. Přidávají se gastrointestinální, méně dechové potíže. Centrální příznaky nejsou v tomto případě výrazné (Bajgar, 1985).

2.3.6.4. Komplikace otravy NPL

Komplikace otravy OFI je možno rozdělit na nespecifické a specifické.

Nespecifické komplikace vyplývají z porušení homeostázy organismu a jsou do určité míry totožné s opožděnou fází otravy. Jde o patologické poruchy srdečního rytmu a respirace. Mohou se manifestovat i v období několika dní po expozici. Z dalších komplikací

to může být v důsledku hepatotoxického působení některých OFI zvýšení aktivit AST, ALT, snížení koncentrace albuminu apod. Závažnou komplikací jsou i sekundární infekce, které se mohou u intoxikovaného organismu (zvýšená bronchosekrece, snížená ventilace) vyvinout již druhý den po intoxikaci (Bajgar, 1985).

Specifickou komplikací otravy OFI je tzv. remise otravy, která je dána buď vyplavením OFI z tukového depa, uvolněním z vazby na bílkoviny krevní plazmy, nebo vzniká v důsledku letální syntézy (po metabolizaci méně toxického OFI v toxičtější). Manifestuje se zhoršením klinického stavu jako další cholinergní krize. V této fázi je nutno pokračovat v intenzivním antidotní terapii. Laboratorně je možno prokázat zvýšenou inhibici krevních cholinesteras; pokud je k dispozici metoda stanovení OFI, prokáže se i zvýšení jeho hladiny v krvi (Bajgar, 1985).

2.3.6.5. Terapie intoxikací

Pro každou závažnější intoxikaci NPL je charakteristický po několikaminutové latenci dramaticky končící průběh provázený vážným narušením základních životních funkcí. Bez podání adekvátní terapie dochází k úmrtí intoxikovaného organismu během 20 – 30 minut. Vzhledem k bezprostřednímu ohrožení života v případě závažných intoxikací musí být terapie podána co nejdříve. Proto má zásadní význam úspěšná první pomoc, která může při včasné a správné poskytnutí zachránit život otráveného a zásadně ovlivnit i další průběh otravy, včetně její prognózy. První pomoc při otravě NPL by tedy měla zahrnovat:

- zamezení dalšímu pronikání jedu do organismu - opuštění zamořeného prostoru, nasazení prostředků individuální ochrany a odmoření zasažených míst, v případě perorální otravy výplach žaludku s přísadou živočišného uhlí
- podání látek specificky zabraňujících toxickému účinku NPL – *antidot*
- zabezpečení základních životních funkcí (při zástavě srdeční činnosti nepřímá srdeční masáž, stabilizovaná poloha při bezvědomí) (Prymula et al., 2002).

Základem terapie otravy NPL je antidotní terapie, kterou je nutno zahájit co nejdříve. Současná terapie otrav OFI sloučeninami obvykle spočívá v kombinovaném podání anticholinergní látky (nejčastěji atropin) a oximu (obvykle pralidoxim, obidoxim nebo oxim HI-6). Anticholinergní látky blokují účinky nahromaděného ACh na

muskarinových cholinergních receptorech, zatímco oximy, látky s nukleofilními vlastnostmi, obnovují aktivitu inhibované AChE defosfonylací enzymu (Bielavská, Kassa, 2003) a tím umožňují její normální funkci.

Anticholinergika (funkční antidota) zabraňují nadměrné stimulaci cholinergních receptorů tím, že brání navázání nahromaděného ACh na tyto receptory. Za lék volby ve skupině anticholinergik je na celém světě považován *atropin*, který antagonizuje v běžných dávkách především periferní muskarinové receptory. Méně ovlivňuje centrální příznaky intoxikace, neboť obtížně prochází přes hematoencefalickou bariéru. Nikotinové příznaky intoxikace nejsou atropinem prakticky ovlivněny. Podává se i.m. nebo i.v. v dávce 2 - 4mg opakovaně v 10 - 30minutových intervalech. Tolerance organismu otráveného NPL je vůči atropinu tak vysoká, že prakticky není možné intoxikovaného jedince předávkovat. Podávání atropinu pokračuje do prvních příznaků atropinizace (rozšířené zornice – mydriáza, zčervenání kůže, suchost sliznic, tachykardie). U těžkých intoxikací je možné doplnit atropinizaci podáváním jiných anticholinergik s převahou centrálního účinku. Do výzbroje AČR je zaveden jako druhé anticholinergikum *benaktyzin*, pro nějž je charakteristický vyšší centrální antimuskarinový účinek (Prymula et al., 2002).

Reaktivátory AChE (kauzální antidota) umožňují návrat k normálnímu přenosu cholinergního nervového vzruchu cestou reaktivace inhibované AChE. Nejběžnějšími dosud používanými reaktivátory ve světě jsou pralidoxim (2-pyridinium-aldoxim-N-methyljodid) známý jako 2-PAM (podává se v dávce 500 až 1000 mg i.m.) a obidoxim (bis-/4-pyridiniumaldoxim-N-methyl/ether dichlorid), vyráběný pod názvem Toxogonin, který se podává v dávce 200 - 250mg i.m. Obecně platí, že reaktivační účinnost je poměrně omezená, přičemž základní příčinou tohoto omezení je, vedle vlastní toxicity reaktivátoru a u některých i špatné rozpustnosti, rychlost stárnutí inhibovaného enzymu (Prymula et al., 2002). Proto akutní intoxikace somanem, u něhož byla pozorována nejrychlejší dealkylace, je považována za nejhůře léčitelnou otravu NPL, zatímco akutní intoxikace látkou VX (NPL s nejvyšší toxicitou), pro niž je charakteristická velmi pomalá dealkylace, je v případě přežití organismu relativně dobře léčitelná (Prymula et al., 2002).

Poměrně nízká terapeutická účinnost reaktivátorů AChE vedla k pátrání po nových, účinnějších oximech, z nichž oxim HI-6 se dočkal na základě experimentálních výsledků také klinických zkoušek a zavedení do léčebné praxe. AČR jako jedna z mála armád na světě má k dispozici lékovou formu oximu HI-6 připravenou k použití při zasažení NPL (prostředek ANTIVA) (Prymula et al., 2002).

Na rozdíl od anticholinergik, jejichž opakované podávání až do příznaků atropinizace je velmi důležité, opakované podávání reaktivátorů AChE bývá zvláště u otravy NPL s rychlou dealkylací inhibované AChE diskutabilní. Ideálním testem k ověření oprávněnosti opakované terapie reaktivátory AChE je laboratorně provedený test reaktivovatelnosti erytrocytární AChE z krevního vzorku zasaženého (Bajgar, 2004).

Základní antidotní terapie skládající se z anticholinergika a reaktivátoru AChE je obvykle doplněna **antikonzulzivní terapií** z důvodu potřeby zabránit záchvatům v CNS vedoucím k tonicko-klonickým generalizovaným křečím a následnému poškození některých struktur CNS. Zvláště při použití periferně působícího anticholinergika atropinu je doplnění antidotní terapie o antikonvulzivum považováno za velmi důležité. Za lék volby je stále považován *diazepam* v dávce 10 mg i.m. Uvažuje se současně o použití alprazolamu nebo klonazepamu (Prymula et al., 2002).

V případě závažné intoxikace vedoucí k akutní respirační insuficienci je třeba počítat s artifiční ventilací spojenou s oxygenoterapií, farmakologickou podporou dýchání (Syntophyllin 240 mg i.v. po 4 hodinách) a regulací acidózy (pomocí infuze s bikarbonátem sodným) (Prymula et al., 2002).

Vývoj terapie akutních otrav NPL se v současné době zaměřuje na přípravu přirozených nebo geneticky upravených detoxikačních látek, které v těle zachytí NPL před spuštěním vlastního toxického účinku (tedy před inhibicí AChE ve vegetativním či centrálním nervovém systému či na nervosvalové ploténce). Z látek, které se za tímto účelem experimentálně zkoumají, dominuje butyrylcholinesterasa, acetylcholinesterasa, karboxylesterasa a různé typy paraoxonasy (Prymula et al., 2002).

V AČR se v oblasti antidotní terapie akutních intoxikací NPL používá kombinace 2 autoinjektorů obsahujících atropin s obidoximem jako základní antidotum a diazepam jako antikonvulzivní látku. Vedle obidoximu se v současnosti používá i oxim HI-6, jenž však vyžaduje speciální typ autoinjektoru (mokro – suchý), neboť je nestabilní v roztoku (Prymula et al., 2002). Navíc je obsažen pro transdermální podání v přípravku TRANSANT, jako profylaktické antidotum (Bajgar, 2009).

V současné době existují i další antidota, která mohou být podávána preventivně (online 6. 4. 2011b). Jsou užívány v podobě tablet. Každá tableta obsahuje jako účinnou látku karbamát - pyridostigmin. Ten je tzv. reverzibilním inhibitorem AChE, blokuje její nativní funkci a tím prakticky brání její aktivní centrum před následnou ireverzibilní inhibicí OFI (Musilek et al., 2011). Dávka by měla být nastavena tak, aby byla zainhibována pouze část AChE v těle, optimálně 25 %. Takto vzniklý komplex

pyridostigmin – AChE se pak postupně (v řádech hodin) rozpadá na aktivní enzym a pyridostigmin. Takže i v případě intoxikace NPL je možno zachovat alespoň bazální aktivitu AChE nutnou k přežití organismu. Tento efekt je omezen na periferní nervový systém, neboť pyridostigmin nepřestupuje přes hematoencefalickou bariéru do mozku (online 6. 4. 2011b).

2.4. Farmakokinetika reaktivátorů AChE

Standardní cestou podání oximových reaktivátorů AChE je aplikace intramuskulární (i.m.). Pro účinek takto podaných léčiv je charakteristický rychlý nástup, který je spojen s rychlou distribucí těchto terapeutik do krevního oběhu a následně pak do dalších tělních kompartmentů (Žďárová Karasová, 2010).

Reaktivátory jsou obvykle podávány ve formě solí (bromidy, chloridy, jodidy, methylsulfonáty apod.). Pro přítomnost kvarterního dusíku v molekule, který je pro účinek reaktivátorů nezbytný, tyto látky prakticky neprostupují přes HEB.

Základní farmakokinetické parametry, které se sledují a které jsou důležité pro vlastní farmakologický účinek, jsou maximální koncentrace (c_{max}) a čas, kdy je této koncentrace dosaženo (t_{max}).

Vylučování oximů probíhá 99 % močí (Sidell, Groff, 1971) a rychlost eliminace není u všech terapeutik stejná.

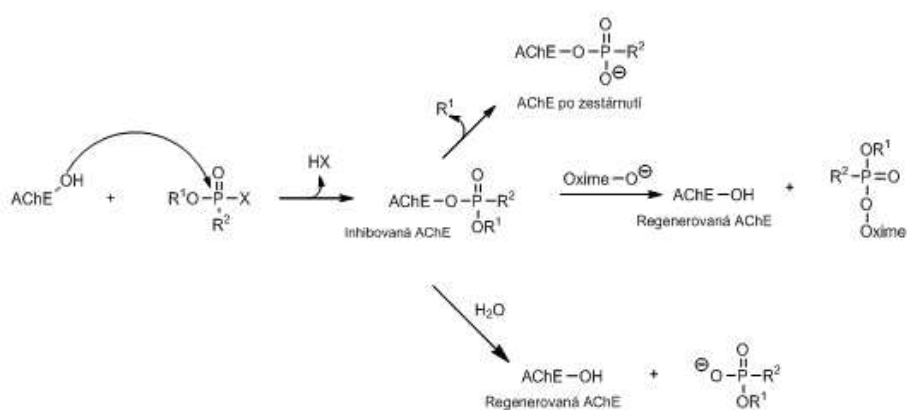
2.5. Mechanismus účinku reaktivátorů AChE

Z chemického hlediska jsou reaktivátory AChE, označované podle funkční skupiny též jako oximy, monokvarterní či biskvarterní pyridiniové sloučeniny s funkční aldoximovou skupinou. Mezi nejznámější zástupce této skupiny látek patří monokvarterní pralidoxim (2-PAM; 2-(hydroxyiminomethyl)-1-methylpyridiniumchlorid) nebo biskvarterní obidoxim (Toxogonin®; 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropan dichlorid) a HI-6 (1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxapropan dichlorid) (Wiesner et al., 2005).

Mechanismus účinku oximových reaktivátorů spočívá v substituci serinu v molekule organofosfátem inhibované AChE oximem za vzniku volné AChE a komplexu

oxim-organofosfát (Obr. 3) (Bajgar, 2004). Tím dojde k plnému obnovení fyziologické funkce AChE a následnému snížení množství neurotransmiteru ACh na fyziologické hladiny; následně se obnoví přenos nervového vzruchu na cholinergních spojích (Žďárová Karasová, 2010).

Pokud nedojde k reaktivaci enzymu, začne postupně docházet k samovolné dealkylaci alkylfosforylové skupiny, která je vázaná na esteratické centrum AChE. Dealkylací se enzym stává nereaktivovatelným a jeho fyziologická funkce již nemůže být obnovena (Bajgar, 2004). Reaktivátory jsou v této fázi již neúčinné. V anglické i české terminologii se pro tento proces užívá název aging (= stárnutí) (Žďárová Karasová, 2010).



Obr. 3: Schéma interakcí AChE-NPL - reaktivátor AChE

2.6. Sledování distribuce reaktivátorů AChE

Ke sledování distribuce reaktivátorů AChE není možné využít metodik nepřímého stanovení, jenž jsou založeny na sledování změn aktivit cholinesteras v jednotlivých kompartmentech organismu. Reaktivátory AChE jsou sice schopny interagovat (slabá inhibice cholinesteras), vážou se však pouze reverzibilně, takže při přípravě vzorků, kdy dochází k ředění, může dojít u části oximů k jejich uvolnění z kavity enzymu (Žďárová Karasová, 2010).

Pro stanovení hladiny oximů v biologických vzorcích je proto vhodnější využít přímou separační metodiku. Vzhledem k náročnosti a dostupnému přístrojovému vybavení byla jako nejvhodnější separační metodika vybrána vysokoúčinná kapalinová

chromatografie (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) (Žďárová Karasová, 2010).

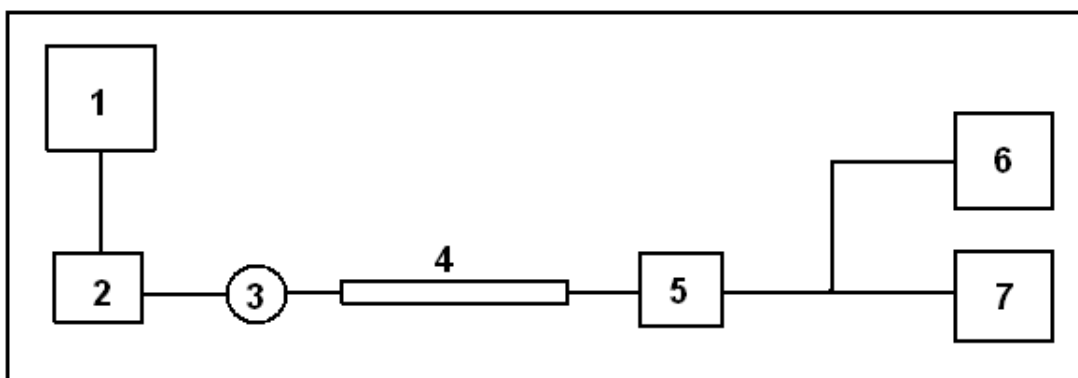
2.6.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High performance liquid chromatography (HPLC) patří v dnešní době mezi jednu z nejmodernějších, nejprogresivnějších a nejvíce používaných separačních metod. Přednostmi kapalinové chromatografie jsou její citlivost, selektivita, rychlost analýzy, minimální množství vzorku potřebného k určité analýze, možnost kvalitativního a současně i kvantitativního hodnocení z jednoho chromatografického záznamu a možnost úplné automatizace (Polová, 2005a).

Dělení látek nastává mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku. Protože k dělení látek lze přitom využít všech vratných dvoufázových mechanismů, je možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech (Polová, 2005a).

2.6.1.1. Instrumentace HPLC

Kapalinový chromatograf se v základní sestavě skládá z částí, které zajišťují transport mobilní fáze (zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, systémy pro tvorbu gradientu v mobilní fázi), dávkování vzorku (manuální či automatické), separaci látek (chromatografická kolona), detekci látek, registraci signálu a vyhodnocení chromatografického záznamu (X-Y zapisovače, číslicové integrátory, počítače s tiskárnou) (obr. 4) (Polová, 2005a).



1 - zásobník(y) mobilní fáze; 2 - vysokotlaké čerpadlo; 3 - dávkovací zařízení;
4 - kolona; 5 - detektor; 6, 7 - registrační a vyhodnocovací zařízení

Obr. 4: Blokové schéma kapalinového chromatografu

2.6.1.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza HPLC chromatografu

Ke kvalitativní a kvantitativní analýze slouží chromatografická křivka. Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas t_R , což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Důkazem totožnosti je shoda retenčních dat t_R chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu eluovaného při stejných chromatografických podmínkách. Stanovení léčiv metodou HPLC je v řadě lékopisných článků spojeno se zkouškami na čistotu. Plocha píku, případně výška píku je kvantitativním údajem a je tedy úměrná koncentraci separované látky. Na základě zjištěných ploch píků se obsah látky ve vzorku určuje pomocí standardu. Používá se buď metoda vnitřního nebo vnějšího standardu (Polová, 2005a).

V systému HPLC jsou používány tři typy separačních modelů – gelově permeační (size exclusion), rozdělovací (partition) a iontově výměnná (ion exchange) chromatografie (McMaster, 2007).

2.6.2. Gelově permeační chromatografie

Tento nejjednodušší chromatografický systém separuje látky na základě velikosti molekul (Philo, 2006). Stacionární fáze je uspořádána do podoby kuliček obsahujících zužující se póry. Mobilní fáze transportuje vzorek k těmto pórům. Pokud je velikost molekul rozpuštěné látky dostatečně malá, procházejí skrz (McMaster, 2007). Jestliže jsou molekuly větší než póry, jsou vymývány z kolony přednostně (Žďárová Karasová, 2010).

2.6.3. Rozdělovací chromatografie

Zjednodušeně se jedná o typ separačního modelu, jenž je typický pro separace v dělící nálevce při extrakci kapalina-kapalina. Pokud existují dostatečně fyzikálně-chemické rozdíly mezi jednotlivými separovanými látkami, budou mít tendenci separovat se v roztoku s podobnou polaritou (Žďárová Karasová, 2010).

Stejným způsobem dochází k separaci na HPLC koloně. Zde je polární buď mobilní fáze nebo stacionární fáze a přitahuje více polárnější sloučeniny ve směsi, která byla nanášena na kolonu. Pokud je stacionární fáze polární a budou nanášeny na kolonu ve směsi dvě látky s rozdílnou polaritou, pak méně polární látka bude z kolony vymývána rychleji (Žďárová Karasová, 2010).

2.6.4. Ionově výměnná chromatografie

Při tomto typu separace látek na koloně neplatí pravidlo, že podobné se mísí s podobným, ale naopak. Látky s opačným nábojem, než je náboj kolony, budou

přitahovány a zadržovány na koloně. Eluce je pak zajišťována vytěsněním nadbytkem iontu, který má stejný náboj jako navázaná sloučenina (McMaster, 2007).

Při přípravě iontově výměnné kolony (stacionární fáze) se používá celá řada materiálů zahrnujících silikagel nebo organické polymery (McMaster, 2007). Na tyto materiály jsou navázány organické substance, které obsahují funkční skupiny buď s permanentním nábojem nebo s možností indukce náboje změnou pH (Žďárová Karasová, 2010).

Stacionární fázi jsou iontoměniče (katexy nebo anexy) a dělit je možné pouze elektrolyty schopné existence v iontové formě. Iontoměniče jsou nerozpustné látky, které ve styku s vodnými roztoky bobtnají a uvolňují elektrolytickou disociací ionty. Tyto uvolněné ionty pak mohou být nahrazeny ionty přítomnými v roztoku, které mají k měniči větší afinitu. Ionexy jsou převážně tuhé látky, které se používají ve formě zrněk nebo perel (Polová, 2005b).

2.7. Modifikace separačního modelu pro stanovení oximů v biologickém vzorku

Oximové reaktivátory AChE jsou hydrofilní látky, tudíž je jejich separace z nástřikového píku dosti problematická, prakticky dochází k eluci, aniž by byly na koloně zadržovány. Jako vhodné řešení se jeví využití reverzní iontově výměnné chromatografie s částečným ovlivněním mobilní fáze dle klasického modelu rozdělovací chromatografie (Spohrer et al., 1994).

Jedná se o úpravu mobilní fáze tak, že do klasické fáze složené z acetonitrilu a deionizované a destilované vody je přidána sůl kyseliny oktansulfonové. Anion této soli (obsahující skupinu SO_3H^-) se váže na C18 alkyly jimiž je kolona vyplněna, tyto záporně nabitě ionty pak zadržují oximové reaktivátory na základě interakcí s kvarterními dusíky (McMaster, 2007).

Zvýšením či snížením množství soli kyseliny oktansulfonové v mobilní fázi lze efektivně ovlivnit retenční čas stanovovaného oximu, tak aby nedocházelo k interakcím s proteiny nebo dalšími látkami, které jsou v biologickém vzorku obsaženy. Což lze považovat za velkou výhodu (Žďárová Karasová, 2010).

Nevýhodou tohoto typu chromatografie je rozšiřování píků, někdy označováno také jako chvostování nebo tailing; tím dochází ke snížení ostrosti a výšky píků, následně ke

snížení citlivosti metodiky. K snížení tohoto charakteristického efektu se do mobilní fáze přidávají opačně nabitě organické látky než jsou ty, jenž se zachytávají na povrchu kolony (v našem případě tedy látky s kladným nábojem). Tyto látky fungují také jako iontově párová činidla. Jeden z možných výkladů mechanismu jejich působení v koloně je maskování náboje stanovované látky. Tetrametylamonium, používané v našich experimentech, se naopak váže na anionty SO_3H^- a zeslabuje tak jejich záporný náboj, tím urychlí pasáž oximů přes kolonu, které se projeví zlepšením kvality píku (Žďárová Karasová, 2010).

Princip této metodiky, byť s částečnými změnami, je používán pro stanovení reaktivátorů AChE na mnoha pracovištích (Spohrer et al., 1994; Sakurada et al., 2003; Tekes et al., 2006).

3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo hodnotit oximové reaktivátory AChE, konkrétně sledovat rozdíly v jejich distribuci v organismu. Tyto látky se v praxi používají převážně jako funkční antidota při terapiích intoxikací způsobených organofosforovými inhibitory AChE. Jejich hlavní úkol tedy spočívá v obnově aktivity tohoto enzymu, mechanismem substituce serinu inhibované AChE, za vzniku volného enzymu a komplexu organofosfát – reaktivátor AChE.

Tato práce měla za cíl jednak vyvinout vhodnou metodiku k přímému stanovení oximů v plazmě, jednak zavést a využít metodiku kontinuálních náběrů krve ve spolupráci s Lékařskou fakultou UK v Hradci Králové a především hledání strukturních závislostí, které by mohly ovlivnit distribuci jednotlivých oximů v plasmě.

Z dřívějších studií je známo, že reaktivační schopnost jednotlivých oximů je závislá především na struktuře reaktivátoru, na počtu a poloze oximových skupin a na délce spojovacího řetězce mezi pyridinovými jádry, eventuálně na substituci tohoto řetězce. Taktéž farmakokinetika může být těmito strukturálními změnami výrazně ovlivněna.

4. METODIKA

Sledování oximových reaktivátorů AChE v plasmě bylo v minulosti studováno několika metodami. Ze spektra možných metod se jako nejvhodnější jeví využití HPLC. Hladina oximů v plasmě i v případě podání terapeutické dávky je natolik vysoká, že je možno k stanovení využít standardní UV/VIS detektor. Limit detekce pro tento typ detektoru je 10^{-7} molární koncentrace oximu na ml plasmy (Žďárová Karasová, 2010).

4.1. Reagencie a chemikálie

Stanovované reaktivátory AChE byly syntetizovány na katedře toxikologie v Hradci Králové standardními metodami. Čistota připravených oximů odpovídala 96 – 99%, ověřena byla standardními analytickými metodami. Ostatní chemikálie byly nakoupeny od společností Merck (Darmstadt, Německo) a Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Dále byla pro analýzy použita destilovaná a deionizovaná voda.

4.2. HPLC systém

HPLC systém, který byl v této studii využit se skládal z P200 gradientové pumpy (Spectra-Physics Analytical, Fremont, USA), 7125 nástřikového ventilu o objemu 10 μ l (Rheodyne, Cotati, USA) a UV1000 (Spectra-Physics Analytical, Fremont, USA). Pro hodnocení chromatogramů byl využit software CSW Clarity 2.6.5.517 (DataApex, Praha, Česká republika)(Žďárová Karasová, 2010).

4.3. Podmínky separace

Jako neoptimálnější stacionární fáze pro tento typ látek byla vybrána C18 kolona LiChrospher® 60. 250 \times 4.6 (5 μ m), v kombinaci se stejným typem předkolony 4 \times 4 (Merck, Darmstadt, Německo) a iontově párová mobilní fáze (Žďárová Karasová, 2010).

Tato mobilní fáze se skládala z 24 % acetonitrilu (gradient grade) – organická fáze a 76 % destilované a deionizované vody – vodná fáze. K tomu, aby docházelo ke správné separaci oximových reaktivátorů od plasmatických proteinů, bylo přidáno iontově párově působící činidlo: sodná sůl oktansulfonové kyseliny ve finální koncentraci 5 mM (Žďárová Karasová, 2010).

Oktansulfonová kyselina se váže na nepolární části na C18 alkyly výše uvedené kolony a volná, záporně nabitá, sulfonová skupina umožňuje interakci s kladným nábojem v pyridiniovém zbytku oximového reaktivátoru. Pro tento typ chromatografie je charakteristický „tailing“, neboli tzv. chvostování či ocasení píků, což zhoršuje jejich odečet a snižuje validitu metody. K snížení tohoto jevu se do mobilní fáze přidává tetramethylamonium chlorid v koncentraci 5mM, který výrazně zvyšuje kvalitu oximového píku (Žďárová Karasová, 2010).

Další možností jak zvýšit separaci píků oximových reaktivátorů od plasmatických proteinů a zároveň zrychlit analýzu snížením retenčního času sledovaného píku je zvolení vhodného pH mobilní fáze. Jako nejvhodnější pH pro stanovení oximů, bylo určeno rozmezí pH od 2,1 – 2,7. Hodnota pH byla upravena přidáním kyseliny fosforečné (H_3PO_4), gradient grade. Pro oximy je charakteristické vytváření syn a anti izomerů. Tato izomerizace se na HPLC projevuje rozštěpením píků, tím se snižuje přesnost odečtu a zároveň i validita zaváděné metodiky. Nalezením vhodného pH mobilní fáze pro jednotlivé oximové reaktivátory AChE lze zabránit vzniku izomerů (Žďárová Karasová, 2010).

Po celou dobu separace byl průtok mobilní fáze isokratický, 1 ml/min. Separace byla prováděna při teplotě 22°C (Karasova et al., 2010). Plasmatické hladiny oximů byly měřeny při vlnových délkách odpovídajících jejich maximům absorpance (Tab. 1) (Žďárová Karasová, 2010).

Tab. 1: Přehled lokálních maxim absorpance oximů a vybrané vlnové délky

Reaktivátor AChE	Maximum absorpance	Vybraná vlnová délka
	nm	nm
HI – 6	298 – 308 – 319	310
Obidoxim	287 – 296 – 306	296
Trimedoxim	282 – 292 – 302	290
oxim K027	275 – 285 – 295	285
oxim K203	282 – 292 – 302	290

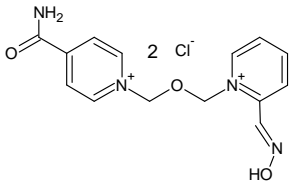
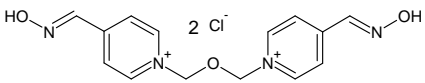
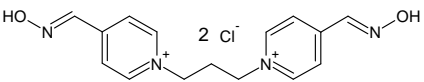
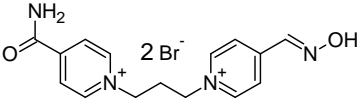
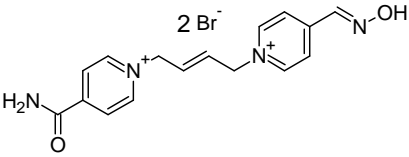
4.4. *In vivo* studie

Pro tento typ farmakokinetických studií jsme se rozhodli využít techniku kontinuálních náběrů krve a to z důvodu užití menšího počtu zvířat, jež byly do tohoto pokusu zahrnuty. Do skupiny, ve které byly sledovány distribuce jednotlivých oximů, bylo zařazeno vždy pouze sedm zvířat (Žďárová Karasová, 2010).

Jako modelová zvířata byli vybráni samci laboratorního potkana (kmen Wistar) o průměrné váze 330 ± 20 g. Zvířata byla zakoupena od společnosti Anlab s.r.o. (Praha, Česká republika). Zvířata byla ustájena v centrálním viváriu Fakulty vojenského zdravotnictví (Hradec Králové, Česká republika) za standardních podmínek (teplota 22 ± 2 °C a relativní vzdušná vlhkost 55 ± 6 %) a střídání 12-ti hodinového cyklu den/noc (začátek světla v 7:00). Standardní dieta a voda byly dostupné *ad libitum*. Po dosažení požadované váhy byla zvířata převezena do vivária Lékařské fakulty Univerzity Karlovy (Hradec Králové, Česká republika), po týdenní aklimatizaci proběhly na tomto pracovišti kontinuální odběry. Experiment proběhl pod dohledem Etické komise Lékařské fakulty Univerzity Karlovy (Hradec Králové, Česká republika) (Žďárová Karasová, 2010).

Pro každé zvíře byl připraven čerstvý roztok oximů rozpuštěním ve fyziologickém roztoku. Zvířatům pak byla tato terapeutika aplikována i.m. v ekvimolárních dávkách do pravého zadního stehna (0,1 ml/ 100g váhy zvířete). Tyto dávky byly blízké dávkám terapeutickým, tedy dávkám odpovídajícím 5 % LD₅₀ jednotlivých oximů (Tab. 2) (Žďárová Karasová, 2010).

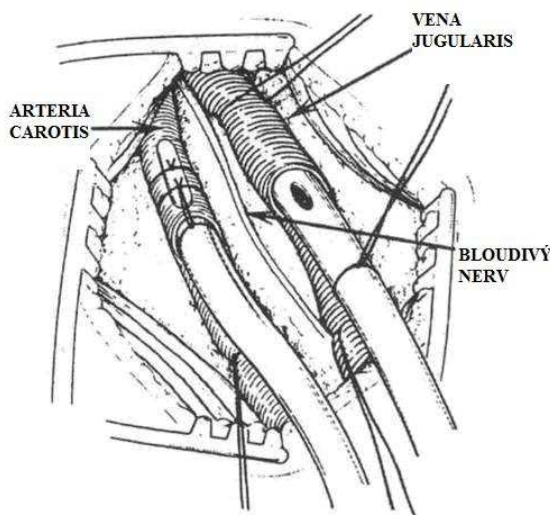
Tab. 2: Přehled struktur a podaných dávek jednotlivých oximů

AChE reaktivátor	Struktura	Molekulární hmotnost	Aplikovaná dávka
		g/ml	mg/kg
HI – 6		288,30	22,23
Obidoxim		288,30	22,23
Trimedoxim		286,33	22,07
K027		286,33	22,07
K203		298,34	23,00

Před vlastními odběry byly provedeny kanylace arteria carotis a vena jugularis (obr. 5) pod pentobarbitalovou narkózou (5 mg/100g váhy zvířete, intraperitoneální aplikace). Plná krev byla odebírána z arteria carotis. Tato krevní ztráta byla kontinuálně doplňována fyziologickým roztokem přes venu jugularis. První odběr vzorku krve proběhl před aplikací AChE reaktivátoru (kontrolní vzorek, minuta 0), po aplikaci pak následovaly odběry v časových intervalech: 3, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120 a 180 minut (300 μ l plné krve) (Žďárová Karasová, 2010).

Odebraná krev (300 μ l) byla heparizována (heparin 1666 m.j./ml – přidáváno 6 μ l). Plasma byla separována centrifugací při otáčkách 1600 \times g, po dobu 10 min a teplotě 4 $^{\circ}$ C (Universal 320R, Hettich, Německo). Vzorky plasmy byly ihned po zpracování uloženy do mrazícího boxu a uchovávány při teplotě -80 $^{\circ}$ C až do HPLC analýzy (Žďárová Karasová, 2010).

V průběhu odběrů nedošlo u žádného zvířete k předčasnému úmrtí a zároveň nebyly pozorovány nežádoucí účinky po podání terapeutik (Žďárová Karasová, 2010).



Obr. 5: Kanylace arteria carotis a vena jugularis

4.5. Úprava vzorků

Jedním z dalších problémů, který byl řešen v rámci zavádění této nové metodiky, byla precipitace proteinů. Standardním precipitačním prostředkem používaným v tomto typu studií zabývajících se farmakokinetikou oximových reaktivátorů, užívaným i na zahraničních odborných pracovištích, je perchloroctová kyselina (také označována jako trichloroctová kyselina, TCA) (Tekes et al., 2006). Toto precipitační činidlo však nebylo kompatibilní s mobilní fází použitou v tomto experimentu. Docházelo k rozdělení píku oximového standardu. Jako nejvhodnější deproteinační činidlo, které neovlivní štěpení píku, byl vyhodnocen acetonitril (Žďárová Karasová, 2010).

Po deproteinaci (60 μ l acetonitrilu a 60 μ l odebrané plasmy) byly vzorky 1 minutu protřepávány na třepačce Lab Dancer (IKA-WERKE, Německo) a poté centrifugovány při 12000 \times g po dobu 12 minut v centrifuze Micro 200 (Hettich, Německo). Po oddělení proteinů byl odebrán supernatant, který byl již bez dalších úprav analyzován HPLC systémem (Žďárová Karasová, 2010).

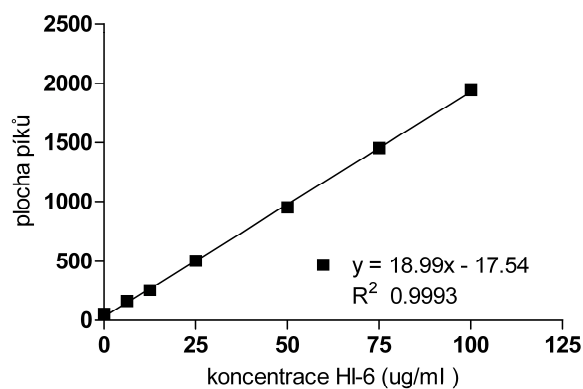
4.6. Kalibrace

Pro přesné určení koncentrace jednotlivých AChE reaktivátorů v plasmě bylo potřeba pro každý oxim připravit kalibraci. Kalibrace byla připravena metodou standardních přídavek oximů do čerstvé krve. Pro výpočet jednotlivých koncentračních bodů na kalibrační křivce byl využit následující postup vycházející z výše popsané úpravy vzorku (Žďárová Karasová, 2010).

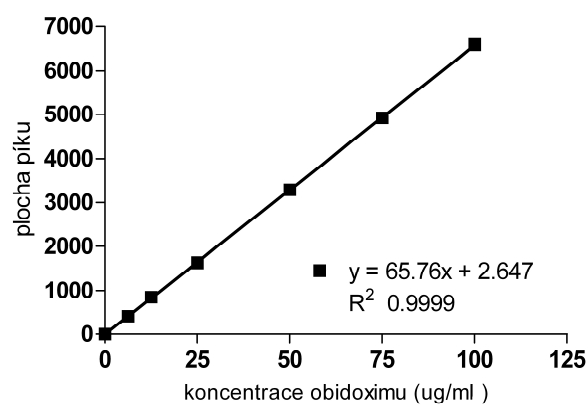
Byla odebrána plná krev laboratorního potkana, která byla následně heparizována (heparin 1666 m.j./ml – přidáváno 6 μ l na 300 μ l krve). Poté bylo odebráno pro každý bod kalibrační křivky 250 μ l krve, k této krvi bylo přidáno 50 μ l roztoku stanovovaného reaktivátoru v koncentraci 1200 μ g/ml (tak bylo získáno 300 μ l spikované krve o finální koncentraci 200 μ g/ml). Takto spikována krev byla centrifugována při 1600 \times g po dobu 10 minut, při teplotě 4°C v centrifuze Universal 320R (Hettich, Německo). Po oddělení erytrocytární masy a plasmy byl předpokládán úplný přechod reaktivátory do plasmy. Po odebrání 60 μ l této plasmy bylo přidáno stejné množství (60 μ l) acetonitrilu, tím došlo k precipitaci proteinů. Směs plasmy a acetonitrilu byla 1 minutu protřepávána na třepačce Lab Dancer (IKA-WERKE, Německo) a poté centrifugována 12 000 \times g po dobu 12 minut v centrifuze Micro 200 (Hettich, Německo). Po oddělení proteinů byl odebrán supernatant, který byl již bez dalších úprav nastříkáván do HPLC systému. Finální koncentrace reaktivátoru AChE v tomto supernatantu pak odpovídala 100 μ g/ml (Žďárová Karasová, 2010).

4.7. Kalibrační křivky

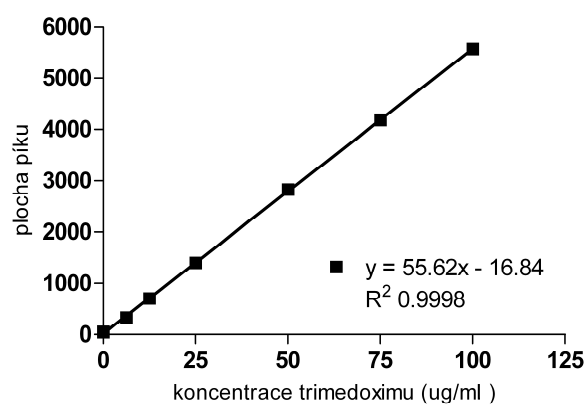
Všechny body kalibrační křivky pak byly připraveny obdobným způsobem, finální koncentrace oximů pak odpovídaly hodnotám: 0 μ g/ml, 1 μ g/ml, 6,25 μ g/ml, 12,5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 75 μ g/ml a 100 μ g/ml. Všechny body kalibračních křivek jednotlivých AChE reaktivátorů byly měřeny třikrát. V grafech byly vyneseny průměrné hodnoty změřených ploch píků odpovídající jednotlivým koncentracím (Žďárová Karasová, 2010).



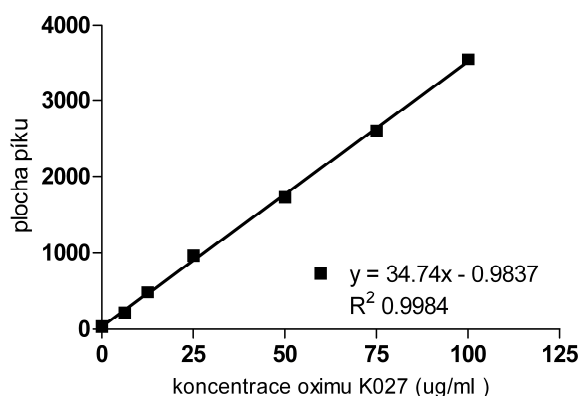
Obr. 6: Kalibrační křivka oximu HI-6



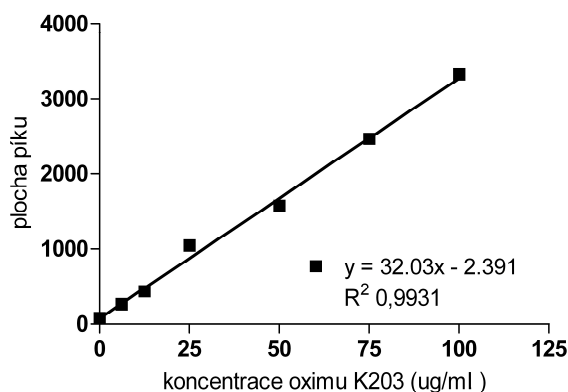
Obr. 7: Kalibrační křivka obidoximu



Obr. 8: Kalibrační křivka trimedoximu



Obr. 9: Kalibrační křivka oximu K027



Obr. 10: Kalibrační křivka oximu K203

4.8. Limity kvantifikace a Limity detekce

Pro každou nově zavedenou HPLC metodiku je nezbytné stanovit limit kvantifikace (Limit of quantification, LOQ) a limit detekce (Limit of detection, LOD) proměřovaných látek. LOQ dané metody je vypočítán jako nejnižší koncentrace vzorku, který byl měřen s přesností 20 %, tedy s relativní chybou menší než ± 20 %. Hodnota LOD je poté odvozena podle níže uvedené rovnice (Tab. 3) (Žďárová Karasová, 2010).

$$LOD = \frac{(3,3 \times LOQ)}{10}$$

Tab. 3: LOQ a LOD pro jednotlivé stanovované oximy

Reaktivátor AChE	Limit kvantifikace (LOQ)	Limit detekce (LOD)
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
HI – 6	5,00	1,50
Obidoxim	2,00	0,61
Trimedoxim	2,50	0,75
oxim K027	3,50	1,10
oxim K203	3,50	1,10

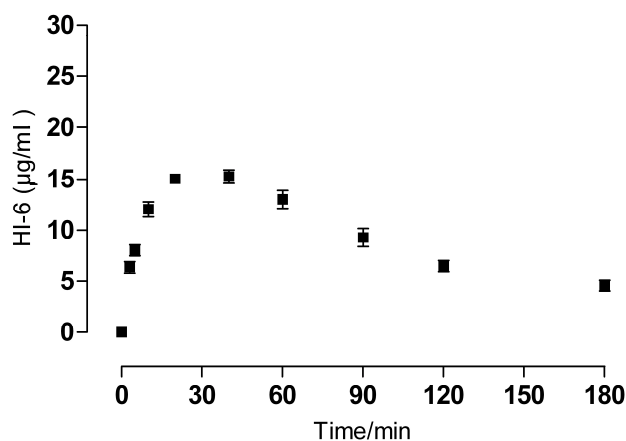
5. VÝSLEDKY

V této části práce jsou shrnuty dosažené výsledky. Plazmatické hladiny oximových reaktivátorů byly stanovovány přímo, pomocí metody HPLC. Jednotlivé oximy byly aplikovány v ekvimolárních dávkách tak, aby bylo možné hodnotit rozdíly v jejich distribuci (Žďárová Karasová, 2010). Tyto hodnoty byly vyhodnoceny a zpracovány do grafů.

Ze získaných křivek je možno pomocí vhodného softwaru vypočítat další, důležité farmakokinetické parametry, jako jsou plocha pod křivkou, distribuční objem, popřípadě clearance látky atd. (Žďárová Karasová, 2010).

5.1. Oxim HI-6

Oxim HI-6 byl aplikován v ekvimolární dávce 22,23 mg/kg. Distribuce tohoto oximu je znázorněna v obrázku 11. Je vyjádřena průměrnými hodnotami změřených koncentrací u sedmi zvířat.

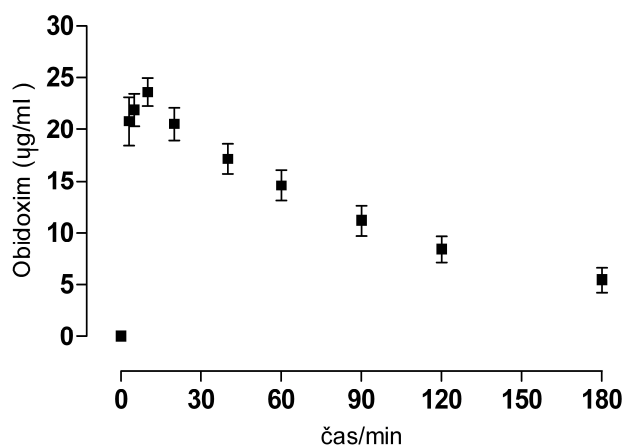


Obr. 11: Distribuce oximu HI-6 v plasmě

Maximální koncentrace tohoto reaktivátoru AChE odpovídala hodnotě $15,30 \pm 0,65$ µg/ml a bylo jí dosaženo ve 40. minutě po i.m. podání.

5.2. Obidoxim

Obidoxim byl aplikován v ekvimolární dávce 22,23 mg/kg. Distribuce tohoto oximu je zaznamenána v obrázku 12. Je vyjádřena průměrnými hodnotami změřených koncentrací u sedmi zvířat.

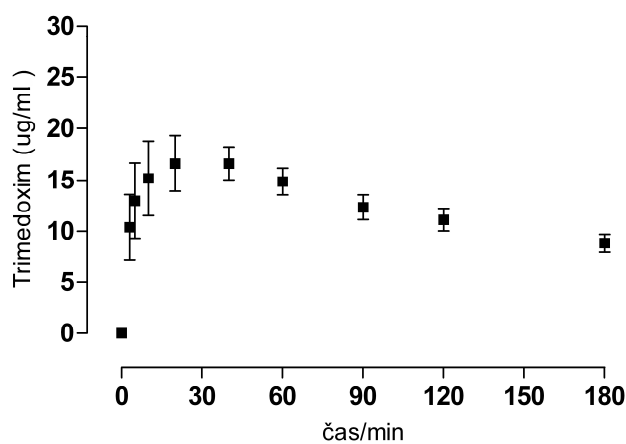


Obr. 12: Distribuce obidoximu v plasmě

Maximální koncentrace tohoto reaktivátoru AChE odpovídala hodnotě $23,60 \pm 1,35$ µg/ml a bylo jí dosaženo v 10. minutě po i.m. podání.

5.3. Trimedoxim

Trimedoxim byl aplikován v ekvimolární dávce 22,07 mg/kg. Distribuce tohoto oximu je znázorněna v obrázku 13. Je vyjádřena průměrnými hodnotami změřených koncentrací u sedmi zvířat.

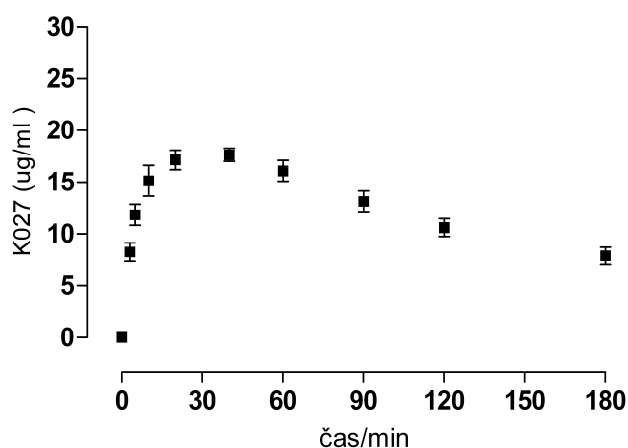


Obr. 13: Distribuce trimedoximu v plasmě

Maximální koncentrace tohoto reaktivátoru AChE odpovídala hodnotě $16,60 \pm 2,68$ a $1,61 \mu\text{g/ml}$ a bylo jí dosaženo ve 20. minutě po i.m. podání.

5.4. Oxim K027

Oxim K027 by aplikován v ekvimolární dávce 22,07 mg/kg. Distribuce tohoto oximu je znázorněna v obrázku 14. Je vyjádřena průměrnými hodnotami změřených koncentrací u sedmi zvířat.

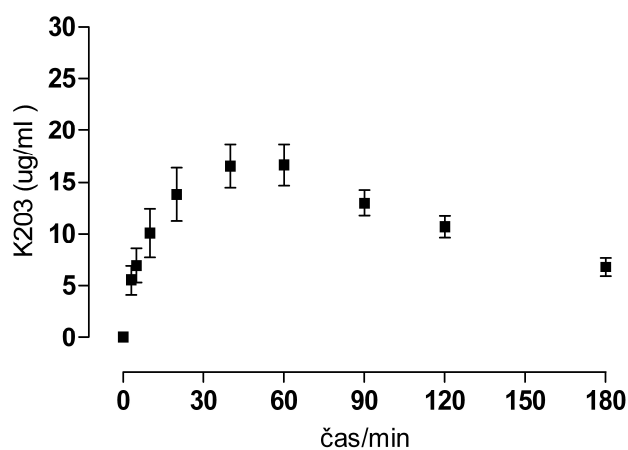


Obr. 14: Distribuce oximu K027 v plasmě

Maximální koncentrace tohoto reaktivátoru AChE odpovídala hodnotě $17,60 \pm 0,62$ $\mu\text{g/ml}$ a bylo jí dosaženo ve 40. minutě po i.m. podání.

5.5. Oxim K203

Oxim K203 byl aplikován v ekvimolární dávce 23,00 mg/kg. Distribuce tohoto oximu je znázorněna v obrázku 15. Je vyjádřena průměrnými hodnotami změřených koncentrací u sedmi zvířat.



Obr. 15: Distribuce oximu K203 v plasmě

Maximální koncentrace tohoto reaktivátoru AChE odpovídala hodnotě $16,60 \pm 2,00$ $\mu\text{g/ml}$ a bylo jí dosaženo v 60. minutě po i.m. podání.

6. DISKUZE

Aktuální pohled na léčbu otrav OFI zahrnuje tři strategie: podání anticholinergních léčiv (např. atropin), reaktivátory AChE (oximy) a antikonvulziva (benzodiazepiny). Vývoj léčby těchto otrav začal s rozpoznáním účinnosti atropinu jako antidota pro jeho parasymptolytické účinky. Atropin, alkaloid izolovaný v roce 1835, byl poprvé úspěšně použit Robertsonem a Fraserem v roce 1863 v léčbě inhibované cholinesterasy. Prokázali účinek atropinu (lokálně podaného do oka) jako antagonisty fysostigminu, na průměr pupily a akomodaci. Později byl Fraserem popsán i antagonismus systémový (Kay, Morrison, 1988). Od té doby se stal atropin základním „stavebním kamenem“ v terapii intoxikací OFI (Antonijevic, Stojiljkovic, 2007).

Co se chemických bojových látek týče, navrhl Eberhard Gross po zjištění, že toxický mechanismus účinku OFI může probíhat podobným způsobem jako u karbamátů (včetně fysostigminu), použití atropinu v léčbě těchto otrav. První experimenty provedené po druhé světové válce však prokázaly, že atropin je mnohem méně efektivní v léčbě OFI intoxikací než v případě otrav karbamáty. To je způsobeno především tím, že atropin působí jako antimuskarinikum (Antonijevic, Stojiljkovic, 2007), což znamená, že kompetitivně a reverzibilně antagonizuje účinek podráždění parasymptatiku a cholinomimetik na muskarinových receptorech (Lincová, Farghali et al., 2007). Podání atropinu má však pouze symptomatický dopad, to znamená, že pomáhá organismu překonat akutní cholinergní krizi bez zásahu do aktivity AChE. Po intoxikaci karbamáty dochází na rozdíl od intoxikace NPL k samovolné reaktivaci enzymu po uplynutí určitého časového období, řádově hodin. Toto vysvětluje rozdíl v účinnosti v léčbě intoxikací karbamátů a ireverzibilních inhibitorů AChE. Atropin není také schopen neutralizovat účinky vyvolané nikotinovou hyperstimulací, ke které v případě otrav OFI taktéž dochází. Účinky ACh na nikotinových neuronálních receptorech blokuje ganglioplegika.

Jako nejdůležitější antikonvulzivum je v současné době používán diazepam. Diazepam je přínosem pro organofosfátem otrávené pacienty tím, že u nich snižuje úzkost, neklid, svalové křeče a v kombinaci s atropinem možnost úmrtí, protože kombinace atropinu a diazepamu je mnohem efektivnější než samostatně podaný atropin. Klinický účinek se dostavuje již za 15 minut (Lincová, Farghali et al., 2007), což je vzhledem k rychlosti, kterou intoxikace OFI probíhá, dalším velkým přínosem. Benzodiazepiny v podstatě potencují inhibiční účinek kyseliny γ -aminomáselné na jejím receptoru. Hlavním důsledkem působení benzodiazepinů v CNS je hyperpolarizace neuronů, která je

činí podstatně méně náchylné k cholinergně vyvolané depolarizaci (Antonijevec, Stojiljkovic, 2007).

Rozvoj specifických antidot, vhodných k regeneraci inhibované AChE NPL, byl založen na předpokladu, že úspěšné regenerace inhibovaných enzymů by mohlo být dosaženo nukleofilním atakem sloučeniny strukturálně podobné ACh, což znamená přítomností kvarterní amoniové skupiny v molekule reaktivátoru. V roce 1956 byl při otravě parathionem v Japonsku odborné veřejnosti představen první připravený a do praxe zavedený oxim pralidoxim (2-PAM) (Antonijevec, Stojiljkovic, 2007). Stal se tak na dlouhá léta jediným funkčním antidotem při terapii otrav OFI.

Další zkoumání v této oblasti vyústilo v syntézy bispyridiniových oximů. Pravidlem byla přítomnost dvou kvarterních (pyridiniových) dusíků, minimálně tříuhlíkatého spojovacího řetězce a přítomnost jedné nebo více oximových skupin. Těmito látkami byly: trimedoxim (TMB-4) - [1,3-Bis (4-hydroxyiminomethyl-1-pyridinio) propan dichlorid], obidoxim (LüH-6) - 1,3-Bis(4-hydroxyiminomethyl-1-pyridinio) -2-oxapropan dichlorid, oxim HI-6 - [1-(2-hydroxyiminomethyl-1-pyridinio)-3-(4-karbamoyl-1-pyridinio)-2-oxapropan dichlorid] a oxim HLö-7 - 1-(((4-(aminokarbonyl)pyridinio)methoxy)methyl)-2,4-bis ((hydroxyimino)methyl) pyridinium diiodid. Tyto oximy byly syntetizovány a představeny jako antidota v letech 1957, 1964, 1967 a 1986 (Antonijevec, Stojiljkovic, 2007).

Oximy byly připraveny ve formě různých solí (např. chlorid, jodid, bromid, laktát, methylsulfát, methansulfonát), které se většinou liší v jejich stabilitě a rozpustnosti. Obecně platí, že pralidoxim, trimedoxim a obidoxim jsou stabilní ve vodných roztocích a mohou být v tekuté formě, v ampulích. Naproti tomu, HI-6 a HLö-7 nejsou stabilní ve vodných roztocích, a proto mohou být uchovávány po delší dobu pouze jako lyofilizovaný prach, který se rozpustí bezprostředně před použitím (Antonijevec, Stojiljkovic, 2007). Liší se také v účinku na organismus – zatímco 2-PAM jakožto zástupce monokvarterních reaktivátorů dokáže částečně reaktivovat AChE i v mozku, přestože ho přes hemoencefalickou bariéru proniká pouze asi 10%. Biskvarterní pyridinaldoximy pronikají do CNS ještě hůř než pralidoxim, pouze asi z 1 %. Mohou ale reagovat se dvěma anionickými centry enzymu a lépe reaktivují AChE na nervosvalové ploténce (Doležal et al., 2009).

Podle studie provedené skupinou odborníků vedenou docentem Kučou a zveřejněné v roce 2010 nemůže být pralidoxim označen za univerzální reaktivátor. Protože po podání terapeutické dávky dosahuje koncentrace 2-PAM v organismu hodnot 10^{-5} M, což je koncentrace nízká k tomu, aby reaktivoval organofosfátem inhibovanou AChE. Při podání vyšších dávek (10^{-3} M) pralidoxim sice inhibovanou AChE reaktivuje, avšak pouze u

některých testovaných inhibitorů. Tato koncentrace 2-PAM je ale tak vysoká, že samotný reaktivátor se sám o sobě stává slabým inhibitorem AChE (Kuca et al., 2010). Jedná se o monokvarterní oxim, jehož farmakodynamika i farmakokinetika byly v minulosti podrobně studovány (Green et al., 1986; Stemler et al., 1991; Houzé et al., 2010). Tyto informace v minulosti vedly k syntézám nových od něj odvozených struktur tzv. biskvarterních reaktivátorů AChE (obidoxim, trimedoxim, metoxim), které byly nedlouho po té taktéž zavedeny do praxe. Jejich terapeutická účinnost byla sice lepší, ale problémem byla relativně vysoká toxicita (Bartosova et al., 2006). To vedlo k dalším snahám nalézt reaktivátory se stejnou účinností, avšak nižší toxicitou.

Následovala řada studií hodnotících farmakokinetické parametry oximu HI-6 na různých animálních modelech (Simons, Briggs, 1983; Sket, Brzin, 1986). V současné době je vedle obidoximu zaveden v AČR pro léčbu otrav NPL. Díky své účinnosti a nižší toxicitě (možná aplikace vyšší dávky) je považován v současnosti za optimální lék volby v případě zasažení neznámou NPL. Podává se v dávce 800 mg i.m. v autoinjektoru (Prymula et al., 2002).

Dalšími kroky bylo zavedení oximu K027 a oximu K203. Tyto látky jsou v současnosti celosvětově testovány pro svou výbornou antidotní účinnost jako potenciální kandidáti místo stávajících látek v terapiích otrav OFI (online 10. 4. 2011). Oxim K203 je momentálně považován za nejlepší reaktivátor AChE inhibované NPL - tabunem (Karasova et al., 2008; Kassa et al., 2008). Oxim K027 by mohl být efektivnější alternativou oximu HI-6 v terapii otrav způsobených pesticidy, jelikož je schopen reaktivovat AChE inhibovanou širokým spektrem těchto látek (Lorke et al., 2010).

Vzhledem k tomu, že v současnosti neexistuje univerzální širokospektrý reaktivátor schopný obnovit aktivitu AChE inhibovanou všemi potenciálními NPL, vývoj nových účinnějších reaktivátorů stále pokračuje. Za tímto účelem je nutné znát, jak jednotlivé strukturální faktory reaktivátorů ovlivňují jejich reaktivační schopnosti. Mezi nejvíce diskutované faktory patří přítomnost a počet oximových skupin, přítomnost a počet kvarterních dusíků, délka a substituce spojovacího řetězce (Kuča et al., 2006). Vedle strukturálních znaků je to i rozpustnost, která je důležitým parametrem ve sledování účinnosti léčby. V případě zmíněného oximu HI-6 je jistou komplikací jeho nestálost ve vodném prostředí. V praxi existuje ve formě dvou solí – chloridu a dimethylsulfonátu, kdy právě vyšší rozpustnost a stálost dimethylsulfonátu umožňuje zvýšit dávku a tedy i účinnost v antidotní léčbě akutní otravy NPL (Kassa et al., 2007).

Z předkládané práce a též z mnoha předchozích (Zdarova Karasova et al., 2010a; Zdarova Karasova et al., 2010b) je evidentní, že distribuce reaktivátorů probíhá v závislosti

na jejich chemické struktuře. Do této studie byly vybrány „klasické“ reaktivátory - obidoxim, trimedoxim, oxim HI-6 a relativně nově syntetizované oximy – oxim K027 a K203.

Nejdůležitějšími parametry, které byly sledovány, jsou t_{\max} a c_{\max} – tedy čas, kdy bylo dosaženo maximální koncentrace a hodnota koncentrace samotné. Protože všechna terapeutika byla aplikována v ekvimolárních dávkách, lze závislost distribuce na struktuře objektivně zhodnotit.

Distribuce u obidoximu například probíhala čtyřikrát rychleji než u trimedoximu – jediným rozdílným strukturálním znakem je náhrada metylenové skupiny kyslíkem ve spojovacím řetězci obidoximu. Oxim HI-6 obsahuje ve své molekule stejný spojovací řetězec jako obidoxim, avšak jedna oximová skupina byla nahrazena skupinou karbamoylovou a poloha oximové skupiny na druhém pyridiniovém jádře byla změněna z polohy *para* do polohy *ortho*. T_{\max} bylo dosaženo přibližně ve čtyřicáté minutě od aplikace.

Dalšími z nově připravených a námi hodnocených reaktivátorů byly oximy K203 a K027. Strukturálně jsou to látky velice podobné – na jednom pyridiniovém jádře se v poloze *para* nachází karbamoylová skupina a na druhém skupina oximová (též poloha *para*). Rozdíl je ten, že do spojovacího řetězce molekuly K203 byla zavedena dvojná vazba v konfiguraci *trans*, čímž došlo k prodloužení doby, kdy bylo dosaženo maximální koncentrace a k jejímu poklesu. Bez ohledu na rozdílný t_{\max} jednotlivých oximů, u všech stanovovaných oximů byly první terapeuticky účinné koncentrace v plasmě nalezeny již ve třetí minutě po aplikaci.

Jako je u většiny léčiv žádoucí, aby účinkovala co nejrychleji, je u reaktivátorů AChE tento požadavek téměř nutností, vzhledem k rychlosti, kterou probíhá průnik do organismu a inhibice AChE organofosforovými sloučeninami. Čím rychleji je podaný oxim schopný inhibovaný enzym reaktivovat, tím více je tak zabráněno vážným účinkům organofosfátu na nervový systém a na organismus. Pokud enzym není včas zreaktivován, dochází ke stárnutí tohoto komplexu enzym – organofosfát a potom už podaný reaktivátor není účinný. Tento proces dealkylace probíhá u různých NPL odlišnou rychlostí (např. poločas dealkylace u somanu – 5 min, VX – dny) (Žďárová Karasová, 2010).

Z tohoto důvodu hraje rychlost včasného zásahu, podání antidota a zejména pak distribuce nezastupitelnou roli v záchraně lidského zdraví a života. Výsledky, kterých jsme dosáhli v této studii, jen potvrzují, že distribuce v organismu strukturou do značné míry ovlivněna je. Z námi získaných hodnot jasně vyplývá, že ačkoliv je molekula obidoximu jedna z prvních syntetizovaných struktur reaktivátorů AChE, přesto dosahuje jednoznačně

nejlepšího času, kdy bylo dosaženo maximální koncentrace. Dvě pyridinová jádra jsou u všech hodnocených oximů samozřejmostí. Je zjevné, že za nejrychlejší distribuci vděčí obidoxim přítomnosti dvou oximových skupin a spojovacímu řetězci, jež má podobu 2-oxopropanu. Prodloužení t_{max} u trimedoximu na dvojnásobek oproti obidoximu je způsobeno byť jen jedinou změnou ve spojovacím řetězci – kterým je propan. Se stejným spojovacím řetězcem jako má obidoxim, pouze s jednou oximovou skupinou, druhou karbamoylovou, oxim HI-6 t_{max} dosahoval čtyřikrát déle než obidoxim, z toho jednoznačně vyplývá, že vliv na rychlost distribuce má i přítomnost a také poloha oximových skupin. O tomto lze diskutovat v porovnání s oximem K027, který dosahoval téměř stejných výsledků jako oxim HI-6. Ve své molekule sice neobsahuje 2-oxopropanový spojovací řetězec, ale poloha byť pouze jedné oximové skupiny je stejná jako u obidoximu, což může na dosažený t_{max} jistý vliv mít. Poslední hodnocenou strukturou byl oxim K203 – do studie byl zařazen pro přítomnost dvojně vazby ve spojovacím řetězci. Jak vyplynulo z výsledků, takováto změna způsobí jen další oddálení t_{max} .

V průběhu této studie byly odhaleny závislosti distribuce reaktivátorů AChE na jejich struktuře. Tyto poznatky by dále mohly sloužit jako zásadní pro syntézu nových reaktivátorů, vhodných k terapii OF intoxikacemi.

7. ZÁVĚR

Tématem této práce je hodnocení distribuce reaktivátorů AChE v organismu. Reaktivátory AChE, podle struktury též nazývané oximy jsou kauzální antidota v terapii intoxikací OFI. Mezi tyto látky, ohrožující lidské zdraví a život, patří jednak pesticidy používané v zemědělství (paraoxon, parathion), ale také chemické bojové látky (sarin, soman, tabun, látka VX), které představují v dnešní době hrozbu zejména v podobě zneužití nejen teroristickými skupinami, ale i v lokálních konfliktech. Výzkumu zaměřenému na terapii intoxikací těmito látkami je proto přikládán nemalý význam.

V kontextu předkládané práce byla také shrnuta problematika intoxikací OFI a možnosti soudobé terapie.

Závěrem lze tedy shrnout, že distribuce do studie vybraných reaktivátorů AChE probíhala velice rychle. Již ve třetí minutě po i.m. aplikaci byly v plasmě zaznamenány relativně vysoké hladiny těchto léčiv. Maximálních koncentrací všechny dosahovaly do šedesáté minuty od aplikace. Distribuce neprobíhala u hodnocených léčiv stejně, a to na základě odlišností v jejich chemické struktuře, což bylo předpokladem této práce. Taktéž byla zavedena nová analytická metodika, díky níž je možné sledovat distribuci oximových reaktivátorů v plasmě.

8. SEZNAM ZKRATEK

AČR	Armáda České republiky
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
ALT	alaninaminotransferasa
AST	aspartátaminotransferasa
CNS	centrální nervový systém
HEB	hematoencefalická bariéra
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
ChAT	cholinacetyltransferasa
CHZ	chemické zbraně
i.m.	intramuskulární podání
i.v.	intravenózní podání
NPL	nervově paralytické látky
OFI	organofosforové inhibitory
OL	otravné látky
OSN	Organizace spojených národů
p.o.	perorální podání
2 – PAM	pralidoxim

9. SEZNAM LITERATURY

ANTONIJEVIC B., STOJILJKOVIC MP. (2007) Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *Clin Med Res.* Vol. 5, pp. 71 – 82. Review.

BAJGAR J. (1985) Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie. KIML J. Prevence nemocí ušních, nosních a krčních, poruch sluchu, hlasu a řeči, Avicenum Praha, pp. 18 – 23.

BAJGAR J., FUSEK J., HRDINA V. (1991) Vojenská toxikologie, Hradec Králové: Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně, pp. 20 – 25.

BAJGAR J. (2004) Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.* Vol. 38, pp. 151 – 216.

BAJGAR J., FUSEK J. (2006) Náhodné a cílené použití toxických látek: Vojenské konflikty, havárie i terorismus. *Vojenské zdravotnické listy* Vol. 75, pp. 70 – 80.

BAJGAR J. (2007) Možnosti vývoje nových chemických zbraní ve světle existující Úmluvy o jejich zákazu. *Vojenské zdravotnické listy* Vol. 76, pp. 141 – 147.

BAJGAR J. (2009) Ochrana mozkové acetylcholinesterázy proti inhibici látkou VX u laboratorních potkanů. *Vojenské zdravotnické listy* Vol. 78, pp. 60 – 65.

BARTOSOVA L., KUČA K., KUNESOVA G., JUN D. (2006) The acute toxicity of the acetylcholinesterase reactivators in mice in relation to their structure. *Neurotoxicity Res.* Vol. 9, pp. 291 – 296.

BIELAVSKÁ M., KASSA J. (2003) Laboratorní přístroje a postupy: Stanovení hladiny acetylcholinu a cholinu v hippocampu potkana kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí. *Chem. Listy* Vol. 97, pp. 1190 – 1192.

BUCKLEY NA., EDDLESTON M., LI Y., BEVAN M., ROBERTSON J. (2011) Oximes for acute organophosphate pesticide poisoning. *Cochrane Database Syst Rev*. Vol. 2: CD005085.

CABAL J., BAJGAR J. (1999) Tabun – návrat po padesáti letech. *Chem. Listy* Vol. 93, pp. 27 – 31.

DOLEŽAL M., OPLETALOVÁ V., MILETÍN M., ZIMČÍK P., KUČEROVÁ M. (2009) Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém, Nakladatelství Karolinum, p. 66.

GREEN MD., TALBOT BG., CLARK CR. (1986) Pharmacokinetics of pralidoxime chloride in the rat. *Life Sci*. Vol. 39, pp. 2263 – 2269.

HOUZÉ P., MAGER DE., RISÈDE P., BAUD FJ. (2010) Pharmacokinetics and toxicodynamics of pralidoxime effects on paraoxon-induced respiratory toxicity. *Toxicol Sci*. Vol. 116, pp. 660 – 672.

KARASOVA JZ., KASSA J., JUNG YS., MUSILEK K., POHANKA M., KUCA K. (2008) Effect of several new and currently available oxime cholinesterase reactivators on tabun-intoxicated rats. *Int. J. Mol. Sci*. Vol. 9, pp. 2243 – 2252.

KARASOVA JZ., NOVOTNY L., ANTOS K., ZIVNA H., KUCA K. (2010) Time-depending changes in concentration of two clinically used acetylcholinesterase reactivators (HI-6 and obidoxime) after administration *in vivo* by using HPLC techniques. *Anal. Sci*. Vol. 26, pp. 63 – 67.

KASSA J., JUN D., KUCA K., BAJGAR J. (2007) Comparison of reactivating and therapeutic efficacy of two salts of the oxime HI-6 against tabun, soman and cyclosarin in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. Vol. 101, pp. 328 – 332.

KASSA J., KARASOVA J., MUSILEK K., KUCA K. (2008) An evaluation of therapeutic and reactivating effects of newly developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice. *Toxikology* Vol 243, pp. 311 – 316.

KAY CD., MORRISON JD. (1988) An evaluation of the effectiveness of intramuscular atropine or homatropine eyedrops in preventing the effects of physostigmine eyedrops on human vision. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* Vol. 73, pp. 511 – 519.

KUČA K., JUN D., MUSÍLEK K. (2006) Vliv délky a tvaru spojovacího řetězce biskvarterních reaktivátorů acetylcholinesterázy na jejich schopnost reaktivovat enzym inhibovaný sarinem. *Vojenské zdravotnické listy* Vol. 75, pp. 37 – 40.

KUCA K., HRABINOVA M., SOUKUP O., TOBIN G., KARASOVA J., POHANKA M. (2010) Pralidoxime--the gold standard of acetylcholinesterase reactivators--reactivation in vitro efficacy. *Bratisl. Lek. Listy* Vol. 111, pp. 502 – 504.

LINCOVÁ D., FARGHALI H. et al. (2007) Základní a aplikovaná farmakologie; druhé, doplněné a přepracované vydání, Galén, pp. 123, 174.

LORKE DE., HASAN MY., NURULAIN SM., SHAFIULLAH M., KUCA K., PETROIANU GA. (2010) Pretreatment for acute exposure to diisopropylfluorophosphate: in vivo efficacy of various acetylcholinesterase inhibitors. *J Appl Toxicol.*; doi: 10.1002/jat.1589.

McMASTER MC. (2007) HPLC, A practical user's guide. New Jersey, USA: John Wiley & Sons Inc.

MUSILEK K., PAVLIKOVA R., MAREK J., KOMLOOVA M., HOLAS O., HRABINOVA M., POHANKA M., DOHNAL V., DOLEZAL M., GUNN-MOORE F., KUCA K. (2011) The preparation, in vitro screening and molecular docking of symmetrical bisquaternary cholinesterase inhibitors containing a but-(2E)-en-1,4-diyl connecting linkage. *J Enzyme Inhib Med Chem.* Vol. 26, pp. 245 – 253.

NEWMARK J. (2007) Nerve agent. *Neurologist.* Vol. 13, pp. 20 – 32.

NEWMARK J. (2004) Nerve agents: pathophysiology and treatment of poisoning. *Semin Neurol.* Vol. 24, pp. 185 – 196.

PATOČKA J. et al. (2004) Vojenská toxikologie. Praha Grada, pp. 11, 30 – 43, 178.

PATOČKA J. (2010) Kdo syntetizoval první organofosforový inhibitor acetylcholinesterasy? *Vojenské zdravotnické listy*. Vol. 79, pp. 126 – 128.

PHILO JS. (2006) Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types? *AAPS Journal*. Vol. 8, pp. 564 – 571.

POLOVÁ V. (2005a) Využití chromatografických metod při hodnocení léčiv XI. (Hodnocení stability pyridoxal isonikotinoyl hydrazinu). Diplomová práce. Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, pp. 6, 15 – 16.

POLOVÁ V. (2005b) Vývoj HPLC metody pro stanovení pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu v plazmě. Rigorózní práce. Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, p. 10.

PRYMULA R. et al. (2002) Biologický a chemický terorismus: informace pro každého, Praha Grada, pp. 117 – 120.

SAKURADA K., MATSUBARA K., SHIMIZU K., SHIONO H., SETO Y., TSUGE K., YOSHINO M., SAKAI I., MUKOYAMA H., TAKATORI T. (2003) Pralidoxime iodide (2-PAM) penetrates across the blood brain barrier. *Neurochem. Res.* Vol. 28, pp. 1401 – 1407.

SIDELL FR., GROFF WA (1971) Intramuscular and intravenous administration of small doses of 2-pyridinium aldoxime methochloride to man. *J. Pharm. Sci.* Vol 60, pp. 1224 – 1228.

SIMONS KJ., BRIGGS CJ. (1983) The pharmacokinetics of HI-6 in beagle dogs. *Biopharm Drug Dispos.* Vol. 4, pp. 375 – 388.

SKET D., BRZIN M. (1986) Effect of HI-6, applied into the cerebral ventricles, on the inhibition of brain acetylcholinesterase by soman in rats. *Neuropharmacology* Vol. 25, pp. 103 – 107.

SPOHRER U., THIERMANN H., KLIMMEK R., EYER P. (1994) Pharmacokinetics of oxime HI-6 and HLo-7 in dogs after i.m. injection with newly developed dry/wet autoinjectors. *Arch. Toxicol.* Vol. 68, pp. 480 – 489.

STEMLER FW., TEZAK-REID TM., McCLUSKEY MP., KAMINSKIS A., CORCORAN KD., SHIH ML., STEWART JR., WADE JV., HAYWARD IJ. (1991) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oximes in unanesthetized pigs. *Fundam Appl Toxicol.* Vol. 16, pp. 548 – 558.

ŠTRĚDA L., UCHYTIL B., KOBLIHA Z. (1999) Chemická analýza prováděná podle Úmluvy o zákazu chemických zbraní. *Chem. Listy* Vol. 93, pp. 575 – 579

ŠEPSOVÁ V. (2010) Testování inhibičního potenciálu reaktivátorů AChE *in vitro*. Diplomová práce. Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy. Hradec Králové, p. 19.

TEKES K., HASAN YM., SHEEN R., KUCA K., PETROIANU G., LUDANYI K., KALASZ H. (2006) High performance liquid chromatographic determination of the plasma concentration of K-27,a novel oxime-type cholinesterase reactivator. *J. Chromatogr. A* 1122, pp. 84 – 87.

VISINGR L., SEDLÁČEK P. (2004) Chemické zbraně. *Armádní technický magazín* Vol. 9, pp. 14 – 17.

WIESNER J., KRÍŽ Z., KUCA K., JUN D., KOCA J. (2005) Počítačové modelování a simulace – nové technologie při vývoji prostředků proti chemickým bojovým látkám. *Vojenské zdravotnické listy* Vol. 74, č. 5 – 6, p. 165 – 171.

ZDAROVA KARASOVA J., STODULKA P., POHANKA M., KUCA K. (2010a) In Vitro Screening of Blood-Brain Barrier Penetration of Monoquaternary Acetylcholinesterase Reactivators. *Analytical Letters* Vol. 43, pp. 1516 – 1524.

ZDAROVA KARASOVA J., POHANKA M., MUSILEK K., ZEMEK F., KUCA K. (2010b) Passive diffusion of acetylcholinesterase oxime reactivators through the blood–brain barrier: Influence of molecular structure. *Toxicology in Vitro* Vol. 24, pp. 1838-1844.

ŽDÁROVÁ KARASOVÁ J. (2010) Stanovení reaktivátorů acetylcholinesterasy a organofosfátů v tkáních – přechod přes bariéry. Dizertační práce. Fakulta vojenského zdravotnictví. Univerzita obrany v Brně. Hradec Králové, pp. 21 – 24, 39 – 44, 47.

WOLF P. (2008) Vlastnosti a účinky bojových otravných látek (online 30. 3. 2011) dostupné

z: http://www.hzspk.cz/index.php?Itemid=148&id=212&option=com_content&task=view

Chemické zbraně: Nervově – paralytické látky (online 1. 4. 2011) dostupné z:

<http://magazin.specialista.info/view.php?nazevclanku=&cislocclanku=2006050201>

Toxic Substances portal – Nerve agents (GA, GB, GD, VX), (online 3. 4. 2011)

dostupné z: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tf.asp?id=524&tid=93#top>

Český obranný standard 666503 (2007) – Automatické signalizátory bojových otravných látek a průmyslových škodlivin. Ministerstvo obrany, Praha, (online 6. 4. 2011a) dostupné

z: <http://www.oos.army.cz/cos/cos/666503.pdf>

IVARSSON U., NILSSON H., SANTESSON J. et al. (1992) A FOA briefing book on chemical weapons: threat, effects, and protection. Umeå, National Defence Research Establishment (online, 6. 4. 2011b) dostupné z:

<http://www.opcw.org/about-chemical-weapons/types-of-chemical-agent/nerve-agents/#c4115>

KUČA K., MUSÍLEK K., JUN D., KASSA J., CABAL J., KARASOVÁ J., POHANKA M., STODŮLKA P., HRABINOVÁ M., MAREK J. (2009) Nové reaktivátory acetylcholinesterázy – kandidáti na zavedení do lékařské praxe. Sborník příspěvků 6. ročníku konference Medicína katastrof a 9. konference SVLFVL ČLS JEP, p. 84. (online 10. 4. 2011) dostupné z : <http://www.zsa.cz/Katastrofy2009/sbornik.pdf>