

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

**Hodnocení aktivit krevních cholinesteráz
ve středoevropské populaci**

Rigorózní práce

Konzultant: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Konzultant specialista: PharmDr. Jana Žďárová Karasová, Ph.D.

Prohlášení

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

„I declare that this diploma thesis is my original authorial work which I elaborated independently (under the guidance of the consultant). All literature and other sources, which I used for the elaboration of this thesis, are listed on the reference page and properly cited in the text. This thesis was not used to earn any other or the same degree.“

Hradec Králové, 13. 5. 2016

Mgr. Zuzana Maděryčová

Poděkování

Z celého srdce děkuji PharmDr. Janě Žďárové Karasové, Ph.D. za její profesionální a lidský přístup v průběhu experimentální části klinické studie a za její cenné rady a pomoc při sepsání této práce. Za spolupráci v oblasti statistického zpracování dat zvlášť děkuji RNDr. Janu Mísíkovi, Ph.D., za zastřešení práce na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové patří díky PharmDr. Marii Vopřsalové, CSc. V neposlední řadě děkuji Bc. Martině Tůmové za její asistenci.

Věnováno památce mého bratrance.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Zuzana Maděryčová

Konzultant: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Konzultant specialista: PharmDr. Jana Žďárová Karasová, Ph.D.

Název rigorózní práce: Hodnocení aktivit krevních cholinesteráz ve středoevropské populaci

Tato studie se zaměřuje na stanovení průměrných hodnot aktivit acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) a butyrylcholinesterázy (BChE, EC 3.1.1.8) ve vzorcích plné krve a plazmy od zdravých dárců (n = 387). Spektrofotometrické stanovení aktivit krevních cholinesteráz bylo založeno na Ellmanově reakci, jejíž průběh byl přizpůsoben charakteru biologického materiálu (Worek *et al.* 1999). U reprezentativního vzorku populace byl pozorován vliv pohlaví, věku a kouření na aktivitu krevních cholinesteráz. U naměřených dat byly zohledněny faktory ovlivňující výsledek měření, kterými jsou koncentrace hemoglobinu (Hb) v případě stanovení aktivit AChE a teplota prostředí v době měření. Statistické zpracování dat umožnilo získat komplexní informace o hodnotách aktivit krevních cholinesteráz ve zdravé populaci.

Výsledky této studie jsou jistým přínosem v oblasti diagnostiky otrav organofosfáty. Srovnání aktivity AChE u intoxikovaného jedince s průměrnou hodnotou AChE ve zdravé populaci umožňuje rychlé posouzení zdravotního stavu jedince a včasnou intervenci. Doplňující informace o intoxikaci poskytuje znalost aktivity BChE, jeví se jako vhodný marker míry zotavení po intoxikaci organofosfáty. Data získaná touto studií nachází využití i v oblasti medicíny, jelikož pokles aktivit cholinesteráz je charakteristickým rysem mnohých onemocnění.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Zuzana Maděryčová

Consultant: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Specialized consultant: PharmDr. Jana Žďárová Karasová, Ph.D.

Title of Thesis: Rating of blood cholinesterase activities in the population of Central Europe

This study is focused on the assessment of the average value of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) activity in blood and plasma samples of healthy donors (n = 387). Spectrophotometric determination of blood cholinesterase activities was based on the Ellman's reaction, the reaction course of which was adjusted according to the character of the biological material (Worek *et al.* 1999). The impact of sex, age and smoking on blood cholinesterase activities was observed in a representative sample of the target population. Data were related to factors affecting the result of the measurement such as haemoglobin (Hb) concentration in the case of AChE activity assessment and environment temperature during the measurement. Statistical data evaluation provided complex information about blood cholinesterase activities in the healthy population.

Results of this work contribute considerably to diagnostics of organophosphate poisoning. Comparison of AChE activity in a poisoned individual with the average value of AChE activity in a healthy population enables a quick health state assessment and early intervention. BChE seems to be an appropriate marker of the recovery rate after organophosphate intoxication thus BChE activity provides additional information about intoxication. Data gained in this study have a use also for medicine owing to the fact that a decrease in blood cholinesterase activities is a characteristic feature of some diseases.

Obsah

1	Zkratky.....	1
2	Úvod	3
3	Teoretická část.....	5
3.1	Charakteristika nervově paralytických látek.....	5
3.2	Toxikodynamika nervově paralytických látek	6
3.2.1	Mechanismus účinku	6
3.2.2	Projevy intoxikace.....	8
3.3	Toxikokinetika nervově paralytických látek.....	9
3.3.1	Absorpce.....	9
3.3.2	Distribuce.....	10
3.3.3	Eliminace	11
3.4	Cholinesterázy v organismu.....	13
3.4.1	Acetylcholinesteráza	14
3.4.2	Butyrylcholinesteráza.....	14
3.5	Management otrav organofosfáty.....	15
3.5.1	Profylaxe a léčba otrav organofosfáty.....	15
3.5.2	První pomoc.....	20
3.5.3	Diagnostika otrav organofosfáty.....	21
4	Cíle práce	23
5	Experimentální část	24
5.1	Přehled použitého materiálu.....	24
5.2	Popis subjektů a vzorků	26
5.3	Ellmanova metoda	26
5.3.1	Postup měření.....	27
5.4	Zpracování dat	29
5.4.1	Korekce dat.....	29

5.4.2	Statistické zpracování dat	31
6	Výsledky	32
6.1	Stanovení hemoglobinu.....	32
6.2	Stanovení aktivit AChE	32
6.3	Stanovení aktivit BChE.....	36
6.3.1	Stanovení aktivit BChE v plazmě	36
6.3.2	Stanovení aktivit BChE v plné krvi.....	36
7	Diskuze.....	40
8	Závěr	44
	Seznam obrázků	45
	Seznam tabulek	46
	Zdroje.....	47

1 Zkratky

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
ALT	alanintransamináza
AST	aspartátaminotransferáza
ASCh	acetylthiocholin
BChE	butyrylcholinesteráza
BSCh	butyrylthiocholin
CarbE	karboxylesteráza
DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoová) kyselina
EDMPA	<i>N,N</i> -dimethyl- <i>O</i> -ethylaminohydrogenfosforečná kyselina
EMPA	<i>O</i> -ethyl-methylfosfonová kyselina
GA	tabun
GABA	kyselina gamma-aminomáselná
GB	sarin
GD	soman
GF	cyklosarin
Hb	hemoglobin
i.m.	intramuskulární
IMPA	<i>O</i> -isopropyl-methylfosfonová kyselina
IMS	intermediální syndrom
i.p.	intraperitoneální
i.v.	intravenózní

7-MEOTA	7-methoxytakrin
MPA	methylofosfonová kyselina
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NTE	neuropathy target esterase
NPL	nervově paralytické látky
OPIDN	organofosfáty-indukovaná pozdní neuropatie
OPIND	organofosfáty-indukovaná neuropsychiatrická porucha
PBS	fosfátový pufr se solemi
PMPA	<i>O</i> -pinacolyl-methylofosfonová kyselina
p.o.	perorální
p.c.	perkutánní
s.c.	subkutánní
SEM	standard error of the mean, střední chyba průměru
sig.	signifikance

2 Úvod

Široké uplatnění organofosfátových sloučenin a relativně snadná dostupnost se pojí s rizikem náhodných, profesních či úmyslných otrav. K profesním intoxikacím dochází nejčastěji v zemědělství při masivním využití organofosfátových pesticidů či insekticidů a dále také v oblasti leteckého průmyslu. Tzv. aerotoxický syndrom, popsáný u leteckých posádek, je následek chronické expozice nízkým dávkám organofosfátů unikajících z hydraulických kapalin či leteckých mazacích olejů při práci motoru, který se podílí na prohřívání vzduchu v kabině letadla (Carletti *et al.* 2011). Výrazný pokles v užívání organofosfátů jako oftalmologik v humánní medicíně či jako antiparazitik ve veterinární medicíně je reakcí na jejich nepříznivý poměr přínosu a rizika (Lamka and Ducháček 1998). Zneužití organofosfátů jako bojových chemických zbraní představuje v současnosti reálnou hrozbu. Relativně nedávné útoky se sarinem v Japonsku (1994 a 1995) či v Sýrii (2013), vyvolaly nejen snahu o potlačení těchto činů, ale také intenzivní výzkum v oblasti profylaxe, léčby a diagnostiky otrav těmito látkami.

AChE a BChE patří do podtřídy esteráz, které katalyzují štěpení esterové vazby u řady endogenních i exogenních látek. Expozice organofosfátům vede k ireverzibilní inhibici cholinesterázy a způsobuje pokles její enzymatické aktivity. Přidružené klinické projevy se odvíjí od tíže intoxikace. Optimálním ukazatelem míry poškození organismu při otravě organofosfáty je aktivita muskulární a neuronální AChE, která je však z praktického hlediska nedostupná. Díky strukturální a funkční podobnosti je erytrocytární AChE považována za jejich vhodnou alternativu (Eyer and Worek 2000).

Znalost fyziologické hodnoty erytrocytární AChE před expozicí organofosfáty, či všeobecná znalost průměrných hodnot AChE ve zdravé populaci, umožňuje potvrdit otravu organofosfáty, posoudit její klinickou závažnost a zhodnotit výstupy včasné terapeutické intervence. V oblasti medicíny poskytuje aktivita erytrocytární AChE informaci o integritě membrány erytrocytů; pokles hodnot je charakteristický pro perniciózní anémii, paroxysmální noční hemoglobinurii či ABO inkompatibilitu (Rackonczay 1988). Stanovení krevní AChE může být přínosné také v oblasti diagnostiky Alzheimerovy choroby. Bylo prokázáno, že vyšší aktivita krevní AChE koreluje s pozitivním nálezem β -amyloidního plaku u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Alkalay *et al.* 2013). Hodnoty aktivity erytrocytární AChE je možné použít pro titraci inhibitorů AChE v terapii Alzheimerovy choroby (Eyer and Worek 2000).

Pokles aktivity BChE není indikátorem závažnosti otrav organofosfáty, jak je tomu v případě AChE. Z širšího pohledu je však aktivita BChE citlivým markerem intoxikace v důsledku preferenční inhibice BChE některými organofosfáty či karbamáty (Eddleston *et al.* 2008). Hodnota plazmatické BChE v čase je ukazatelem eliminace organofosforových inhibitorů z organismu a odráží tak postupné zotavení organismu po prodělané intoxikaci (Cannard 2006, Eddleston *et al.* 2008). Aktivita plazmatické BChE odráží také řadu patofyziologických změny v organismu. Poukazuje na probíhající zánět, nutriční stav organismu, dostupnost aminokyselin jako substrátu a/nebo poškození proteosyntézy. Zvýšená aktivita byla pozorována u obezity, diabetu 1. a 2. typu, hypertriglyceridemie, hypercholesterolemie, hyperthyroidismu či uremie. Snížená aktivita BChE naznačuje možné hepatocelulární poškození, cirhózu, jaterní metastázy či akutní jaterní selhání (Santarpia *et al.* 2013).

Podle nejnovějších poznatků medicíny jsou snížené aktivity krevních cholinesteráz odpovědí organismu na traumatické poškození mozku, které samy o sobě poškození prohlubují. Krevní cholinesterázy se tak mohou uplatňovat jako prognostické markery mortality u tohoto typu poranění (Zhang *et al.* 2015).

3 Teoretická část

Nervově paralytické látky (NPL) jsou díky své jednoduché výrobě a extrémně vysoké toxicitě vůči savcům jedny z nejnebezpečnějších chemických zbraní. Při výzkumu nových pesticidů popsal v roce 1935 německý chemik Gerhard Schrader vysokou toxicitu N,N-dimethylamidofosforylfluoridu, který se stal předlohou pro syntézu první NPL, tabunu. Schraderův objev se stal základem pro tajný vojenský výzkum ve snaze syntetizovat nové, toxičtější sloučeniny pro bojové použití. (Tucker 2006, Bajgar 2011), Toho bylo dosaženo v roce 1939, kdy byl syntetizován sarin, fluorovaný derivát kyseliny fosfinové, pojmenovaný na počest svých objevitelů Schradera, Ambrose, Rittera a Lindeho (Coleman 2005, Bajgar 2011). V roce 1944, objevil nositel Nobelovy ceny Richard Kuhn ještě toxičtější látku, soman. Odhaduje se, že během 2. světové války bylo vyrobeno až 30 000 tun tabunu a 10 tun sarinu, avšak tyto zbraně nebyly nacistickým Německem nikdy využity (Tucker 2006, Bajgar 2011).

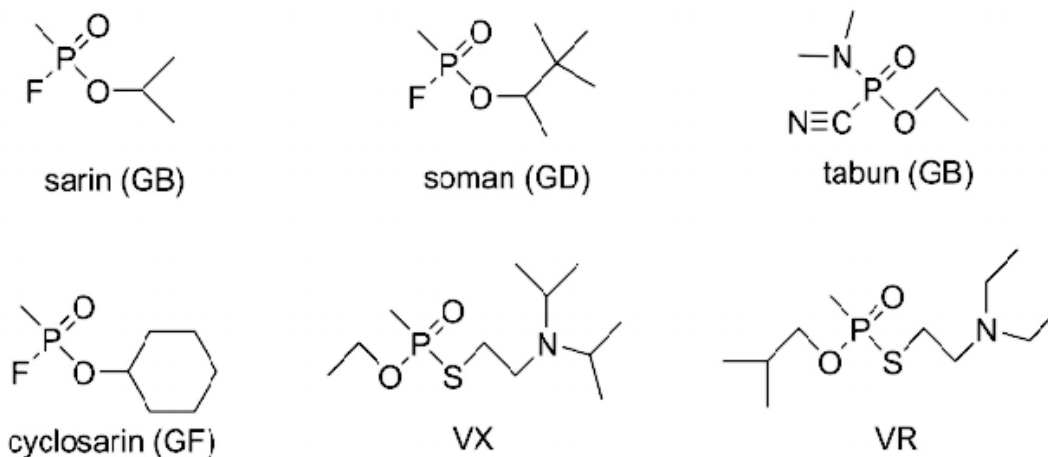
3.1 Charakteristika nervově paralytických látek

NPL jsou při vysoké čistotě prakticky bezbarvé a bez zápachu. To znemožňuje jejich senzorickou detekci a zvyšuje jejich nebezpečnost. Severoatlantická aliance (NATO) člení NPL na G-látky a V-látky, podle jejich struktury, fyzikálně-chemických vlastností a státu původu (Sidell 1997).

Skupinu G-látek tvoří sarin (GB), soman (GD), tabun (GA) a cyklosarin (GF). Jedná se o deriváty kyseliny fosfinové s navázanou nitrilovou skupinou (tabun) nebo fluoridovou skupinou (sarin, soman, cyklosarin). G-látky jsou viskózní kapaliny vykazující vysokou tenzi par a vysokou těkavost, což předurčuje jejich inhalační toxicitu. Koncentrace v ovzduší dosahující 0,03–0,08 mg.l⁻¹ představuje střední letální koncentraci vedoucí po minutové expozici k úmrtí 50 % exponovaných, nechráněných osob. V terénu si zachovávají toxické účinky po dobu 12–24 hodin. (Patočka 2004).

Skupina V-látek je reprezentována látkou VX a látkou VR. Strukturně se jedná o fosfonylované sloučeniny thiocholinu, postrádající elektronegativní nitrilovou nebo halogenidovou skupinu. Tato skutečnost podmiňuje kromě nízké hydrofility molekuly i extrémně nízkou těkavost zabezpečující plnou resorpci z nechráněné pokožky a zároveň vysokou odolnost vůči enzymatické i neenzymatické hydrolýze. V-látky, při srovnání

s G-látkami, vykazují zvýšenou toxicitu při působení přes kůži (Haláček 2011). V terénu jsou velmi perzistentní, svou toxicitu v terénu vykazují týdny až měsíce (Patočka 2004). Chemické struktury zástupců NPL shrnuje **Obr. 1**.



Obr. 1 Chemické struktury nervově paralytických látek

Modifikováno z: Pohanka (2011).

3.2 Toxikodynamika nervově paralytických látek

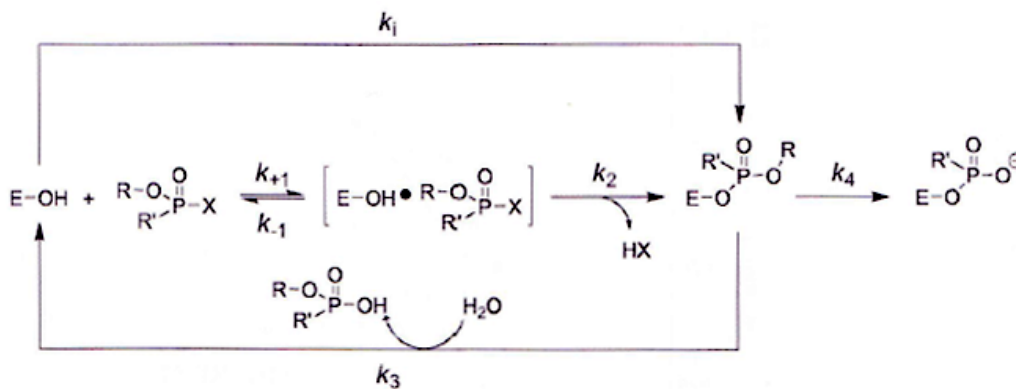
3.2.1 Mechanismus účinku

Centrální a periferní nervová soustava jsou hlavním místem zásahu NPL. Dominující mechanismus účinku spočívá v inhibici neuronální AChE. Tento enzym je koncentrován zejména v pregangliových zakončeních parasymptiku a symptiku, postgangliových zakončeních parasymptiku, symptiku inervujícího potní žlázy a také v axonálních zakončeních somatických motorických vláken (Brody *et al.* 1995). Za fyziologických podmínek hydrolyzuje AChE neuromediátor acetylcholin (ACh) v synaptické štěrbině a/nebo nervosvalové ploténce, čímž dochází k ukončení synaptického přenosu. Tím je zajištěna možnost opakované interakce ACh s nikotinovými či muskarinovými receptory a následný převod vzruchu.

Interakce NPL s AChE vede v závislosti na struktuře organofosfátu k fosforylaci nebo fosfonylaci hydroxylové skupiny serinu (Ser²⁰⁰) v aktivním centru enzymu. Spontánní hydrolyza aduktu, vedoucí ke vzniku volného reaktivovaného enzymu a oxidovaného

organofosfátu, probíhá velmi pomalu. Pokud nedošlo k spontánní či oximy-indukované reaktivaci enzymu, může navázaný organofosfát podléhat dealkylaci (tzv. stárnutí enzymu, aging), čímž se kompletně znemožňuje reaktivace enzymu (Feldman 1999, Taylor 1996). Působení organofosfátu v aktivním místě enzymu popisuje **Obr. 2**. Inhibice AChE má za následek akumulaci ACh v synaptické štěrbině a/nebo nervosvalové ploténce, nadměrnou stimulaci a desenzitizaci nikotinových a/nebo muskarinových receptorů s následnou klinickou symptomatologií.

Organofosfáty vykazují také toxicitu nezávislou na inhibici AChE. Při expozici organofosfáty byla popsána přímá interakce s muskarinovými, nikotinovými, serotoninovými, N-methyl-D-aspartátovými (NMDA) receptory, snížená denzita cholinergních receptorů, porušená funkce GABA-ergního, noradrenergního, dopaminergního systému evokující zvýšené uvolnění glutamátu. Mimo to dochází i k zásahu do energetického metabolismu. Funkčními důsledky těchto změn jsou například zvýšená excitotoxicita, neurotoxicita, blokáda oxidativního metabolismu s acidózou, čímž se dále prohlubuje toxický efekt organofosfátů (Voicu *et al.* 2010).



Obr. 2 Reakce organofosfátu s hydroxylovou skupinou serinu v aktivním místě enzymu

Reverzibilní reakce vedoucí ke vzniku komplexu enzym-substrát (k_{+1} , k_{-1}) dává vzniku fosfonylovanému aduktu (k_2), který může podléhat spontánní reaktivaci (k_3) či nevratné dealkylaci (k_4). Souhrnný proces popisující vznik inhibovaného enzymu je označen k_i . Převzato z: Richardson, Worden and Makhaeva (2009) a Richardson (1992).

3.2.2 Projevy intoxikace

Toxické působení organofosfátů se může manifestovat třemi různými způsoby: akutní cholinergní krizí, intermediálním syndromem (IMS) a pozdní neuropatií (Yang and Deng 2007).

Hyperstimulace cholinergního nervového systému v důsledku expozice organofosfátům se označuje termínem akutní cholinergní krize. Její symptomy se podle typu a lokalizace dělí na muskarinové, nikotinové a centrální. K periferním muskarinovým symptomům dochází v důsledku kumulace ACh v nervových zakončeních parasymptiku. Projevy jsou patrné u sekrečních žláz dýchacích cest, exokrinních žláz, očního aparátu, gastrointestinálního a urogenitálního traktu. Dominujícími příznaky jsou dušnost, prodloužený výdech, excesivní bronchiální sekrece, rhinorrhea, salivace, lakrimace, mióza, abdominální křeče, průjem a močová inkontinence. Za periferní nikotinové symptomy zodpovídá kumulace ACh ve vegetativních gangliích a v zakončeních motorických nervů, což způsobuje projevy zejména na úrovni kardiovaskulárního systému a pohybového aparátu. Dochází k projevům sympatikotonie; k tachykardii, hypertenzi, dále ke svalové slabosti, svalovým záškubům, křečím popř. k paralýze. Centrální symptomy jsou projevem akumulace ACh v jednotlivých strukturách mozku a spinální míchy, vedoucí ke stimulaci nikotinových i muskarinových receptorů. Příznaky jsou svým charakterem velmi nespecifické a zahrnují zmatenost, neklid, poškození paměti, závratě, bolest hlavy, úzkost, třes až respirační depresi (Kassa 1992, Eddleston *et al.* 2008). U závažných intoxikací organofosfáty vede akutní cholinergní krize ke smrti v důsledku respiračního selhání. Podílí se na něm útlum dechového centra v prodloužené míše, paralýza dýchacích svalů, bronchokonstrikce a zvýšená bronchiální sekrece (Munro 1994).

IMS se projevuje u pacientů bez zjevných cholinergních příznaků, přibližně 2–4 dny po expozici organofosfáty. Dominujícím rysem je slabost dýchacích svalů (diafragma, mezižeberní svalstvo, přídatné dýchací svalstvo), slabost svalů inervovaných motorickým kranialním nervstvem, svalová slabost horních končetin a útlum hlubokých šlachových reflexů (Karalliedde *et al.* 2006). Při zajištění umělého dýchání a další podpůrné terapie odezní IMS přibližně za 5–18 dní (Yang and Deng 2007).

Organofosfáty-indukovaná pozdní neuropatie (organophosphate-induced delayed neuropathy, OPIDN) je možným projevem intoxikace organofosfáty, jejichž expozice

nemusela být doprovázena zřetelnou symptomatologií. Mechanismus asociovaný s rozvojem OPIDN spočívá ve fosforylaci a ireverzibilní inhibici tzv. neuropatické esterázy (neuropathy target esterase, NTE) a v narušení homeostázy vápníku. Patologicky dochází k axonální degeneraci a demyelinizaci motorických i senzitivních nervů (Emerick *et al.* 2012). OPIDN nastupuje přibližně 1–2 týdny po expozici organofosfáty a vyznačuje se parestézií končetin, ataxií, křečemi v oblasti lýtek s následnou paralýzou svalů dolních končetin, která se šíří v proximálním směru. Stadium přetrvává 1–2 měsíce, kdy se k paralýze přidává i denervace s těžkou atrofií svalů horních i dolních končetin. I přes možnost částečné reparace je patrná prakticky doživotní spasticita a abnormální šlachové reflexy (Patočka 2004).

Organofosfáty-indukovaná neuropsychiatrická porucha (organophosphate-induced neuropsychiatric disorder, OPIND) je další pozdní projev intoxikace organofosfáty. Vyznačuje se úzkostí, depresí, poruchou paměti a koncentrace (Jamal 1997). Tento stav je kontrastem k psychickým projevům při akutní intoxikaci, čímž paradoxně připomíná tzv. syndrom z vysazení organofosfátů (Tan *et al.* 2009).

3.3 Toxikokinetika nervově paralytických látek

3.3.1 Absorpce

Absorpce, distribuce a eliminace (spojující dohromady metabolismus a exkreci) jsou základní fáze popisující osud toxické látky v organismu. NPL mohou vstupovat do systémové cirkulace prakticky všemi branami vstupu, nejčastěji však dýchacími cestami, kůží, spojivkovým vakem a trávicím ústrojím. Fyzikálně-chemické vlastnosti organofosfátu (zejména těkavost, rozpustnost ve vodě), fyziologické parametry tkáně a cesta podání předurčují rychlost absorpce a nástup toxického účinku. Vysoká těkavost G-látek předurčuje vysokou inhalační toxicitu a limitovanou kožní toxicitu; při potřísnění kůže sarinem se odpařuje až 98 % látky. V-látky, ve srovnání s G-látkami, vykazují až o tři řády nižší tenzi par. Díky tomu je kůže dominantní bránou vstupu pro V-látky (Marrs *et al.* 2007, Chilcott *et al.* 2008).

Inhalace NPL vede k respirační toxicitě v průběhu několika málo minut. Příznaky mohou u mírné intoxikace přetrvávat v řádu hodin, u těžší intoxikace v řádu dní (Pfaff 1998). Inhalace nadměrného množství par NPL vede v řádu sekund až minut k náhlé

ztrátě vědomí, apnoe a svalové paralýze. Maximální efekt, zpravidla končící smrtí v důsledku respiračního selhání, nastupuje mezi 20–30 min (Sidell *et al.* 1997, Berkenstadt *et al.* 1991). Průnik NPL přes kůži vede po 3 min až 2 h k projevům pocení a svalovým záškubům, které trvají 3–5 dnů (Sidell *et al.* 1997). Páry NPL vstupující do organismu spojivkovým vakem způsobují v rámci minut bolestivé překrvení oka a miózu, přetrvávající po dobu 2–3 dnů. Penetrace tabunu přes spojivku dosahuje letálního efektu v průběhu 1–10 min, přičemž nástup smrtícího efektu je srovnatelný s inhalací letální dávky (EPA 1985c). Požití NPL se projevuje nikotinovými a muskarinovými příznaky, které nastupují u mírné otravy do 30 min a přetrvávají 2–5 dní v závislosti na tíži intoxikace.

Efektivní toxická dávka organofosfátu se odvíjí od fyzikálních a biologických ztrát, které jsou charakteristické pro různé cesty podání. Ztráty rostou při různých způsobech podání v pořadí: intravenózní (i.v.), intramuskulární (i.m.), intraperitoneální (i.p.), perorální (p.o.), perkutánní (p.c.) (Bajgar and Voicu 2009).

3.3.2 Distribuce

Po průniku organofosfátu do systémové cirkulace dochází ke snadné distribuci do okolních tkání. V nich může organofosfát vykazovat toxický účinek, podléhat metabolizaci a exkreci popř. se deponovat. Distribuční objem je pro každou NPL rozdílný. Sarin je distribuován převážně do mozku, jater, ledvin, soman a tabun dosahují nejvyšších koncentrací v hypotalamu, jak prokázaly experimenty na myších (Little *et al.* 1986, Woltius *et al.* 1986, Hoskins *et al.* 1986).

Organofosfáty, stejně jako jiná xenobiotika, mohou být vázány na plazmatické bílkoviny (zejména albumin, β -globulin, *B-esterázy*). Albumin je přítomný v krvi ve vysokých koncentracích (4,6 g/100 ml; 0,6 mM), čímž reprezentuje 50–60 % celkového množství proteinu v plazmě. Bylo prokázáno, že sarin, cyklosarin, soman, tabun a ve vysokých dávkách i látka VX fosforylují tyrosinový zbytek (Tyr⁴¹¹) albuminu, čímž inhibují esterázovou a acylamidázovou aktivitu albuminu (Black *et al.* 1999, Williams *et al.* 2007). Vzniklý komplex je poměrně stabilní, poločas spontánní reaktivity dosahuje 6,5 dne (při 25 °C, pH 8), bez následných známek „stárnutí“ enzymu. Stabilita komplexu umožňuje detekci prostřednictvím hmotnostní spektrofotometrie, čehož lze

využít pro zjištění expozice organofosfáty (Li *et al.* 2008). Interakce albuminu se somanem se výrazně nepodílí na detoxifikaci sloučeniny.

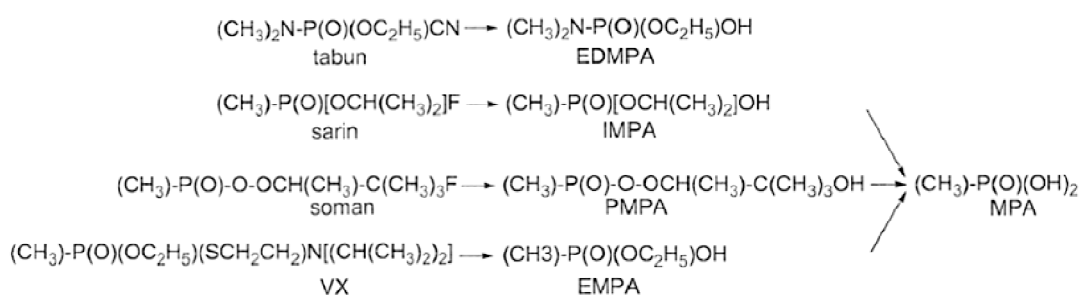
Díky své vysoké lipofilitě se organofosfáty popř. jejich toxické metabolity deponují v tukové tkáni. Distribuce organofosfátu do tukové tkáně snižuje koncentrace organofosfátu v systémové cirkulaci, čímž snižuje toxický efekt. Redukce hmotnosti v důsledku změny životosprávy či probíhajícího onemocnění může mobilizovat množství organofosfátu z depotu a tím znovu vyvolat projevy intoxikace (Ecobichon *et al.* 1977). Povaha svalové tkáně také umožňuje deponaci organofosfátu (Van Helden and Wolthius 1983). Unikátní schopnost deponace byla pozorována zejména u somanu. Značený soman vykazoval v experimentech na myších výraznou kumulaci také v plicích a v kůži, což vypovídá o vazbě somanu na alveolární epitel plic a na keratinocyty v epidermis (Kadar *et al.* 1985, Wolthius *et al.* 1983).

3.3.3 Eliminace

Organofosfáty interagují různými způsoby s mnoha typy esteráz. Tradiční dělení podle prof. Aldridge (1953) rozlišuje enzymy interagující s organofosfáty na *A-esterázy* a *B-esterázy*. Označení *C-esterázy* náleží enzymům, které s organofosfáty nijak neinteragují.

Enzymatická hydrolýza je nejvýznamnější metabolickou drahou pro G-látky, která vede ke vzniku hydrofilních, méně toxických či netoxických produktů. Skupina enzymů, které hydrolyzují organofosfáty jako substráty, se označuje termínem *A-esterázy*. Enzymy spadající do této skupiny se v literatuře označují podle substrátu, který hydrolyzují (paraaxonáza, somanáza atd.) nebo podle chemické struktury, kterou štěpí (fosfotriesteráza, fosforylfosfatáza atd.). Hlavním produktem hydrolytického štěpení je odpovídající *O*-alkyl-methylfosfonová kyselina. Jedná se o *O*-isopropyl-methylfosfonovou kyselinu (IMPA) v případě sarinu, *O*-pinacolyl-methylfosfonovou kyselinu (PMPA) v případě somanu a *N,N*-dimethyl-*O*-ethylaminohydrogenfosforečnou kyselinu (EDMPA) v případě tabunu. Všechny tyto produkty podléhají další metabolizaci za vzniku velmi stabilní methylfosfonové kyseliny (MPA), (Jokanović 2009). U somanu bylo zjištěno, že 95 % LD₅₀ podléhá intenzivní metabolizaci. Zbýlých 5 % LD₅₀ zodpovídá za toxický efekt v centrální a periferní nervové soustavě (Fonnum and Sterri 1981).

Látka VX, charakteristický zástupce V-látek, je přítomna v krvi ve formě protonovaného aminu. Ve srovnání s G-látkami je látka VX méně specifický substrát pro *A-esterázy* i karboxylesterázy (CarbE) a je mnohem pomaleji hydrolyzována za vzniku *O*-ethyl-methylfosfonové kyseliny (EMPA) a MPA. Ve srovnání s G-látkami, může dusík či síra v molekule V-látek podléhat oxidaci za vzniku oxidovaných produktů, což představuje přídatnou eliminační dráhu. Hydrolyza jedné či více alkylesterových vazeb u látky VX podmiňuje vznik produktů, které mohou mít zachovanou anticholinesterázovou aktivitu (Jokanović 2009). **Obr. 3** shrnuje produkty metabolizace u základních zástupců nervově paralytických látek.



Obr. 3 Metabolizace tabunu, sarinu, somanu a látky VX v organismu

Zkratky: EDMPA, *N,N*-dimethyl-*O*-ethylaminohydrogenfosforečná kyselina; IMPA, *O*-isopropylmethylfosfonová kyselina; PMPA, *O*-pinacolyl-methylfosfonová kyselina, EMPA, *O*-ethylmethylfosfonová kyselina; MPA, methylfosfonová kyselina. Převzato z: Jokanović (2009).

Druhá skupina enzymů interagující s organofosfáty jsou *B-esterázy*. Vystupují jako enzymy, jejichž aktivita je organofosfáty inhibována. Mezi hlavní zástupce této skupiny patří AChE (EC 3.1.1.7), BChE (EC 3.1.1.8), CarbE (EC 3.1.1.1), chymotrypsin a trypsin. Dominujícím rysem *B-esteráz* je přítomnost hydroxylové skupiny serinu v aktivním místě enzymu, který umožňuje interakci s organofosfáty. AChE, BChE i CarbE vystupují jako scavengery NPL. Uvolnění acylového radikálu organofosfátu za současné fosforylace či fosforylace aktivního místa enzymu inaktivuje značnou část absorbované dávky organofosfátu (Patočka 2004). CarbE je typickým příkladem *B-esterázy*, nicméně vazba tohoto enzymu k organofosfátu je reverzibilní na rozdíl od AChE a BChE. CarbE tak katalyzuje hydrolyzu organofosfátových esterů (Fukuto 1990). Interakce CarbE se sarinem a somanem a vede ke vzniku netoxických metabolitů

IMPA a PMPA, čímž se podílí na detoxikaci nervově paralytických látek (Jokanović *et al.* 1996).

Hlavním eliminačním orgánem nervově paralytických látek a jejich metabolitů jsou ledviny, jak prokázaly toxikokinetické studie se sarinem (Little *et al.* 1986). Eliminační poločas konečného metabolitu sarinu je 3,7 h, přičemž maximální koncentrace IMPA a MPA v moči byla dosažena 10–18 h po expozici (Shih *et al.* 1994, Nakajima *et al.* 1998). Koncentrace těchto metabolitů v moči úzce koreluje s klinickou symptomatologií intoxikace. Signifikantní akumulace ^3H -somanu byla u myši pozorována v močovém měchýři a lumen střev, což potvrzuje hlavní cesty eliminace (Kadar *et al.* 1985).

3.4 Cholinesterázy v organismu

Esterázami označujeme podtřídu hydroláz, pro kterou je charakteristické štěpení esterové vazby v molekule na alkohol a příslušnou kyselinu. Jim podřazené cholinesterázy vykazují substrátovou specifitu k esterům cholinu, podílí se však i na hydrolýze thioesterů či acylamidů (Plageman *et al.* 2002, Zhukovskii 2003). Mezi typické zástupce patří AChE a BChE, jejichž primární struktura vykazuje vysoký stupeň homologie (více jak 50 %).

Pro katalytické působení cholinesteráz jsou zásadní tři části enzymu: β -anionické místo (periferní anionické místo), aromatické hrdlo a aktivní centrum. Na povrchu cholinesterázy, při vstupu do aromatického hrdla se nachází β -anionické místo, které je považováno za klíčové místo podílející se na rozvoji Alzheimerovy choroby. To je způsobeno interakcí β -anionického místa s β -amyloidem, což umožňuje tvorbu amyloidního plaku. Průchod aromatickým hrdlem podmiňuje interakci substrátu s aktivním centrem. Aromatické hrdlo je užší u AChE než u BChE, což má dopad i na jejich substrátovou specifitu. Aktivní centrum cholinesteráz je u AChE i u BChE velmi podobné. Skládá se z α -anionického místa, které je zodpovědné za správnou orientaci ACh vůči esterovému (esteratickému) místu štěpícímu esterovou vazbu. Pro funkčnost α -anionického místa jsou zásadní aminokyseliny Trp⁸⁴ a Phe³³⁰, pro esterové místo pak Ser²⁰⁰, Glu³²⁷, His⁴⁴⁰. Právě Ser²⁰⁰ v aktivním centru interaguje s mnoha látkami. Vytváří stabilní vazbu s organofosfáty, které jsou schopny ireverzibilně inhibovat aktivní místo AChE i BChE. Vazbu vytváří i karbamátové sloučeniny (fyzostigmin,

pyridostigmin, rivastigmin aj.); tato vazba je však reverzibilní a podléhá spontánní hydrolýze (Pohanka 2011).

AChE a BChE se liší v několika klíčových místech, které způsobují odlišnosti v jejich biochemických parametrech jako je například velikost vazebného místa, míra dealkylace navázaného organofosfátu či schopnost podléhat spontánní či oximy-indukované reaktivaci (Doctor *et al.* 2001).

3.4.1 Acetylcholinesteráza

AChE, označovaná také jako pravá cholinesteráza nebo specifická cholinesteráza, je svou funkcí hlavní cholinesterázou v organismu. Enzym se vyskytuje ve formě monomeru, dimeru, tetrametu a může obsahovat segment se strukturou podobnou kolagenu, zabezpečující jeho přilnutí k membráně. Ve vysokých koncentracích je přítomna v centrální i periferní nervové soustavě, v nervosvalových ploténkách a na povrchu erytrocytů. Neuronální AChE je syntetizována v těle neuronu, sekretována Golgiho aparátem a transportována podél axonu do nervového zakončení (Brody 1995). Primární funkcí je štěpení neuromediátoru ACh a ukončení neurotransmise. Erytrocytární AChE se podílí zejména na degradaci ACh v systémové cirkulaci. AChE vykazuje vysokou afinitu k ACh (popř. k jeho analogu acetyl- β -methylcholinu nebo acetyl- β -methylthiocholinu) při velmi vysoké katalytické aktivitě; každá molekula AChE rozštěpí za sekundu 25000 molekul ACh (Quinn 1987, Taylor *et al.* 1994). Nadbytek substrátu způsobuje inhibici AChE (Bajgar 2009).

3.4.2 Butyrylcholinesteráza

BChE, označována také jako pseudocholinesteráza, nespecifická cholinesteráza nebo plazmatická cholinesteráza je svým zastoupením prevalentní cholinesterázou v organismu (Brody 1995). Asi 95 % celkové BChE je v organismu zastoupeno ve formě tetrameru, formy dimeru a monomeru jsou pravděpodobně degradačními produkty (Chatonnet and Lockridge 1989). BChE se nachází ve vysokých koncentracích v játrech, slinivce břišní, plazmě a v gliových buňkách, nicméně BChE byla nalezena také u rostlin či některých mikroorganismů (Bajgar 2009). BChE vykazuje velmi rozsáhlou substrátovou specifitu. Preferenčními substráty BChE jsou butyrylcholin popř. butyrylthiocholin (BSCh), propionylcholin popř. propionylthiocholin. Tento

enzym se výrazně podílí na odbourávání řady xenobiotik, zejména succinylcholinu, prokainu, kokainu, heroinu, acetylsalicylové kyseliny aj. BChE není, na rozdíl od AChE, inhibována nadbytkem substrátu. Význam BChE není dosud plně objasněn. Některé výzkumy naznačují význam BChE jako embryonální AChE (Chatonnet and Lockridge 1989). Zdá se, že BChE obsažená v gliových buňkách se podílí na cholinergním přenosu (Mesulam *et al.* 2002).

3.5 Management otrav organofosfáty

Intoxikace organofosfáty je spojena s vysokou úmrtností. Na konci 21. století byla intoxikace smrtelná pro 40 % postižených i přes nasazení všech dostupných prostředků. Jedinci s neměřitelnou koncentrací erytrocytární AChE mají velmi špatnou prognózu, jedinci se závažnými klinickými symptomy mají střední naději na zotavení, pokud přežijí 8–10 dní po expozici (Ševela *et al.* 2011). V současné době existuje možnost alespoň částečně předcházet toxickému efektu organofosfátů, v případě projevené intoxikace lze toxické účinky potlačit či zmírnit a zvýšit tak naději na přežití.

3.5.1 Profylaxe a léčba otrav organofosfáty

Toxický efekt organofosfátů lze odvrátit protichemickými prostředky a farmakologickými prostředky, které nachází uplatnění v oblasti profylaxe i léčby.

Mezi prostředky protichemické ochrany patří ochranná maska a ochranný oděv, které znemožňují či omezují průnik toxické látky do organismu. Při zasažení nechráněné kůže, oděvu či předmětů využíváme dekontaminační prostředky. Ve vojenské sféře se k dekontaminaci využívá individuální protichemický balíček vzor 80 (IPB vz. 80), který obsahuje adsorpční činidlo v podobě mikronizovaného aktivovaného bentonitu, gázové přířezy k jeho roztírání a mýdlo (Kassa 2003).

V rámci farmakologické profylaxe se uplatňují karbamáty, které vystupují jako reverzibilní inhibitory AChE. Karbamoylují aktivní centrum AChE, čímž ho dočasně blokují a tím znemožňují ireverzibilní inhibici organofosfátem. Karbamoylovaná AChE podléhá spontánní hydrolyze, čímž znovu poskytuje funkční enzym (Bajgar 2009). Vyšší profylaktická účinnost vysokodávkových režimů karbamátů je na úkor zvýrazněných vedlejších účinků v důsledku kumulace ACh v centrální i periferní nervové soustavě. Pro jejich minimalizaci se s výhodou kombinují reverzibilní

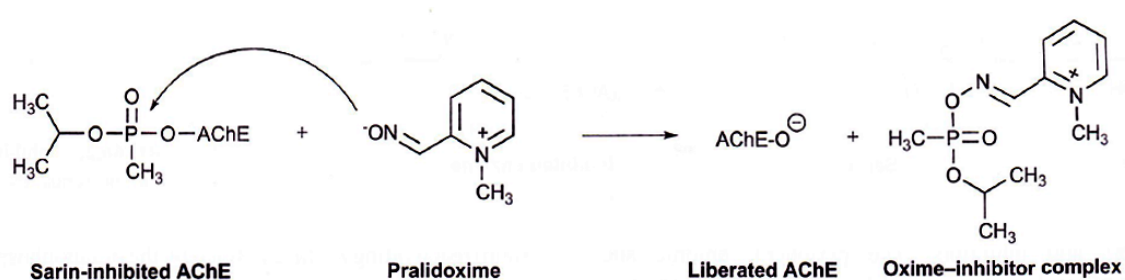
inhibitory AChE s centrálními anticholinergiky (Bajgar 2012). Nejvýznamnější zástupci ze skupiny karbamátů jsou pyridostigmin a fyzostigmin, které se liší svou schopností procházet přes hematoencefalickou bariéru (Scott 2007). Originální české profylaktické antidotum PANPAL je kombinací vyšší dávky pyridostigminu s dvojitou anticholinergik – benactyzinu a trihexfenidylu, které zcela eliminují nežádoucí účinky pyridostigminu (Kassa 2003). Huperzin A, tacrin a 7-methoxytacrin (7-MEOTA) patří mezi látky jiných chemických struktur, které také vystupují jako reverzibilní inhibitory AChE (Bajgar 2012).

V terapii otrav organofosfáty využíváme funkční a kauzální antidota. Do skupiny funkčních antidot spadají parasymptolytika a centrální anticholinergika. Ta antagonizují cholinergní receptory, které jsou při intoxikaci organofosfáty excesivně stimulovány kumulujícím se ACh. Lékem volby u akutních otrav organofosfáty je atropin. Působí zejména na úrovni periferních muskarinových receptorů, centrální muskarinové receptory ovlivňuje minimálně. Nikotinové příznaky nejsou atropinem potlačeny (Patočka 2004). Atropin, aplikovaný i.v. či i.m., výrazně potlačuje příznaky intoxikace, jakými jsou bronchokonstrikce, zvýšená bronchiální sekrece, rhinorea, zvýšená lakrimace, salivace, nauzea, zvracení, průjem, pocení a další (Gupta 2009). Centrální muskarinové účinky jsou efektivně potlačovány benactyzinem, popř. jeho alternativní náhradou biperidenem či skopolaminem, čímž dochází ke zlepšení psychického stavu intoxikovaného jedince (Patočka 2004).

Symptomatickou léčbu intoxikací organofosfáty doplňují benzodiazepiny, které vystupují jako antikonvulziva, anxiolytika a hypnotika. Alostericky zesilují vazbu kyseliny gamma-aminomáselné (GABA) ke GABA_A-receptoru v centrální nervové soustavě, což evokuje otevření chloridového kanálu a hyperpolarizaci buňky. Mezi hlavní účinky benzodiazepinů patří zmírnění úzkosti a neklidu, snížení tonu kosterního svalstva a potlačení pohotovosti ke křečím (Lüllmann *et al.* 2012). Včasná aplikace benzodiazepinu předchází komplikacím jako je metabolická acidóza či minerální dysbalance, které vznikají v důsledku zvýšených energetických nároků svalů (Bajgar 2012) Nejužívanějším antikonvulzivem u intoxikací organofosfáty je diazepam. Jeho doporučená terapeutická dávka v případě konvulzí činí 10–20 mg i.v., pokud ke konvulzím nedochází, volí se dávky nižší 5–10 mg i.v. (Johnson and Vale 2007, Antonijević and Stojiljković 2007). Ukázalo se, že diazepam zesiluje účinek nízkých

dávek atropinu. Kombinace diazepamů s atropinem snižuje mortalitu účinněji než izolované podání atropinu nebo oximu (Sellström 1992).

U otrav organofosfáty vystupují reaktivátory cholinesteráz jako kauzální antidota. Přerušují vazbu organofosfátu k serinu v aktivním místě enzymu, čímž obnovují jeho katalytickou funkci. Účinkují za předpokladu neuskutečněné dealkylace organofosfátu, díky které se stává inhibice cholinesterázy nevratnou (Milatović and Jokanović 2009). Chemismus reakce popisuje **Obr. 4**.



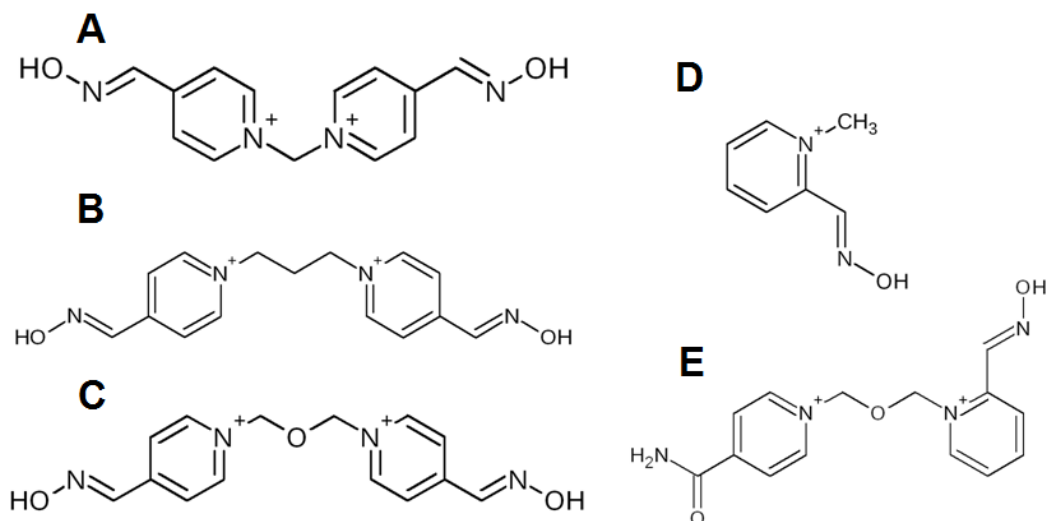
Obr. 4 Mechanismus reakce mezi reaktivátorem (pralidoximem) a sarinem inhibované AChE

Oximátový aniont atakuje pozitivně polarizovaný atom fosforu v navázaném organofosfátu. Tím dochází k rozštěpení vazby mezi organofosfátem a hydroxylovou skupinou serinu v aktivním centru AChE. Výsledkem je neškodný komplex reaktivátoru s organofosfátem a reaktivovaná, plně funkční AChE. Převzato z: Kuča *et al.* (2009).

Pro účinek reaktivátoru je zásadní přítomnost alespoň jednoho kvartérního dusíku a nukleofilní skupiny v molekule. Kvartérní dusík pyridinového jádra ve struktuře reaktivátoru zodpovídá, obdobně jako kvartérní dusík ACh, za afinitu k aktivnímu centru, k α -anionickému místu cholinesterázy. Díky tomu vystupují vysoké koncentrace reaktivátorů jako slabé inhibitory cholinesteráz. Na druhou stranu, kvartérní dusík reaktivátoru brání dostatečnému prostupu přes hematoencefalickou bariéru, což znemožňuje jeho uspokojivý účinek (Kuča *et al.* 2004a, Kuča *et al.* 2004b, Lüllmann *et al.* 2004). Délka a struktura postranního a/nebo spojovacího řetězce ovlivňuje reaktivační schopnost molekuly. Maximální reaktivační účinnost vykazuje tříuhlíkatý popř. čtyřuhlíkatý spojovací řetězec a jednouhlíkatý postranní řetězec (Kuča *et al.* 2003, Jong *et al.* 1981).

Oxim vystupuje jako nukleofilní skupina, která ochotně deprotonuje za vzniku oximátového aniontu, který je přímo zodpovědný za reaktivační proces. Pro reaktivaci je nutná alespoň jedna oximová skupina v molekule (Kuča *et al.* 2006). Pozice oximu vzhledem ke kvartérnímu dusíku se zásadně podílí na úspěšnosti reaktivace u konkrétního organofosfátu. Oximová skupina reaktivátoru v pozici *ortho* účinně reaktivuje cyklosarinem inhibovanou cholinesterázu, oximová skupina reaktivátoru v pozici *para* vykazuje účinnost pro komplex tabunu s cholinesterázou, v případě sarinu a látky VX jsou obě zmíněné polohy oximové skupiny dostatečně efektivní (Bajgar 2012).

Mezi klinicky užívané reaktivátory patří pralidoxim, obidoxim a látka HI-6, v minulosti se užíval také trimedoxim, ve vojenské sféře methoxim (Musílek *et al.* 2011). Ze současně dostupných reaktivátorů je pralidoxim a obidoxim účinný proti působení cyklosarinu, sarinu a látky VX. Obidoxim navíc dosahuje vysoké účinnosti v terapii otrav organofosfátovými insekticidy. V současné době se vkládají velké naděje do reaktivátoru HI-6, který je dosud nejúčinnějším antidotem proti NPL v humánní medicíně (Kassa 2002, Kassa *et al.* 2012, Lundy *et al.* 2006). Včasná aplikace vykazuje klinickou účinnost i proti působení somanu, jehož intoxikace je velmi obtížně léčitelná (reakční poločas dealkylace u somanem-inhibované AChE je 10 minut). Látka HI-6 však není univerzálním antidotem; v případě intoxikací tabunem či organofosfátovými insekticidy nedosahuje dostatečného efektu. To potencuje snahu o nalezení nových reaktivátorů, které by byly použitelné pro širší spektrum organofosfátových sloučenin a zároveň dostatečně účinné. V posledních dvou dekáдах byly syntetizovány nové slibné oximy označované jako HI-6 DMS, HLö-7, MMB4, Ortho-7, K027, K048, K074, K075 a K203 (Musílek *et al.* 2011, Bajgar 2012). Chemické struktury nejvýznamnějších reaktivátorů AChE jsou vyobrazeny v **Obr 5**.



Obr. 5 Struktury reaktivátorů AChE

A; methoxim; B, trimedoxim; C, obidoxim; D, pralidoxim; E, HI6. Vytvořeno v programu ACD/ChemSketch, version 12.01, 2010.

Perzistence organofosfátů v těle je velmi vysoká a jejich odstranění z krevního kompartmentu je komplikované. Forsírovaná diuréza nevede k eliminaci hydrofóbního organofosfátu, pokud nedošlo k jeho biotransformaci. Hemodialýza či hemoperfuze jsou efektivní u nezávažných projevů intoxikace, nicméně umožňují eliminovat pouze zlomek cirkulujícího organofosfátu (Ševela 2011). Podání přirozených krevních bioscavengerů výrazně redukuje množství organofosfátu zasahujícího cílovou tkáň. Katalytické či stoichiometrické scavengery dosahují efektivní neutralizace toxické látky v organismu. Katalytické scavengery vykazují schopnost hydrolyzovat organofosfáty, čímž vedou ke vzniku netoxických produktů (Masson and Rochu 2009). Perspektivními enzymy z této skupiny se zdají být paraoxonázy a CarbE (Ghanem 2005, Masson *et al.* 1998, Sterri and Fonnum 2009). Stoichiometrické scavengery využívají vzniku ireverzibilní vazby organofosfátu k enzymu za vzniku netoxického aduktu. V tomto případě se zdají být využitelné cholinesterázy, zejména pak BChE (Saxena *et al.* 2004, Clark *et al.* 2002). Úskalí v jejich použití představuje nejen podání vysokých dávek enzymu, tj. 3 mg/kg vysoce purifikované BChE, ale také obtížná výroba. BChE lze purifikovat z lidské plazmy při velmi nízké výtěžnosti (1 mg BChE z 1 l lidské plazmy), popř. rekombinantní BChE lze izolovat z kozího mléka produkovaného transgenními zvířaty (Masson and Rochu 2009). Oba způsoby využívající scavengery chrání tkáň před toxickým působením organofosfátů bez výrazných vedlejších účinků.

3.5.2 První pomoc

Akutní intoxikace organofosfáty je stav bezprostředně ohrožující zdraví. Pokud to situace umožňuje, je klíčové zabránit kontaktu toxické látky s organismem za využití ochranných pomůcek (ochranná maska, jednorázová pláštěnka) či dekontaminačních pomůcek a bezprostředně opustit kontaminovaný prostor. Při zasažení oční sliznice je vhodné provést výplach, optimálně 1–2% roztokem bikarbonátu sodného, roztokem kyseliny borité či fyziologickým roztokem (Patočka 2004).

Prioritou při poskytování zdravotní péče u otravy organofosfáty je dozor nad intoxikovaným jedincem a včasná akce v momentě zhoršení klinického stavu. V rámci první pomoci je bezprostředně nutná léčba bronchopulmonálních projevů. Odsávání sekretů s využitím nazotracheální a endotracheální intubace doplněné o oxygenoterapii snižuje riziko vzniku život ohrožující hypoxie. V dalším kroku je klíčové zajistit intravenózní vstup a podat atropin, optimálně již při prvním kontaktu s postiženým či během transportu. Ačkoliv je dávkovací režim atropinu stále diskutován, je nutné docílit dostatečného snížení bronchiální hypersekrece bez nadměrných projevů intoxikace atropinem. V závislosti na tíži intoxikace se dospělému podává nitrožilní bolus 1–3 mg atropinu. Pokud symptomy intoxikace neustoupily po prvním bolusu (zejména u pacientů v kritickém stavu s hypotermií, hypotenzí nebo zástavou dýchání), je možné další dávku navýšit až na 5 mg (Ševela 2011, Edlesston *et al.* 2008). Nitrožilní aplikace atropinu může být opakována nejméně v pětiminutových intervalech. Atropin je podáván až do dosažení klinického zlepšení (80 tepů/minutu, systolický tlak nad 80 mm Hg, dilatace zornic). Pro stabilizaci pacienta podáváme infuzi zajišťující 10 až 20 % celkové podané dávky atropinu během hodiny. Dávkování atropinu korigujeme podle plicního poslechového nálezu, krevního tlaku, dilatace zornic a pocení (Eddleston *et al.* 2008). Reaktivátory AChE by měly být aplikovány vždy až po podání atropinu. Konkrétního zástupce reaktivátorů AChE volíme podle jeho citlivosti k organofosfátu. Antidota nejsou účinná u otrav methylorganofosfátovými estery jako je metyldiazinon, dimethoat, endothion, fenthion, formothion, malathion, mepinvos trichlorfon aj. Pralidoxim se aplikuje pomalou i.v. injekcí (15–30 min) v dávce 15–30 mg/kg u dospělých i dětí, s odstupem 3–8 hodin. Maximální denní dávka je 12 g. Aplikace pralidoximu je možná také i.v. infuzí, i.m. injekcí, popř. s.c. injekcí. Obidoxim se rovněž aplikuje pomalou i.v. injekcí v dávce 3 mg/kg. Počáteční dávka (u dospělých

obvykle 250 mg) může být zopakována jednou až dvakrát. U dětí nemají dávky překročit 5 mg/kg. Účinek obou antidot nastupuje velmi rychle za současného zlepšení klinického stavu. Toxické symptomy se však mohou vrátit z důvodu zpožděné reabsorpce či redistribuce (Ševela 2011).

3.5.3 Diagnostika otrav organofosfáty

Diagnostika otrav organofosfáty by měla být rychlá a přesná. Při podezření na otravu organofosfáty je zásadní zjistit potíže postiženého a provést klinické vyšetření. Pro verifikaci otrav lze provést stanovení aktivit krevních cholinesteráz, které je však zřídka dostupné v čase nutného klinického řešení. Výrazný pokles aktivit u erytrocytární AChE a plazmatické BChE může být důsledek expozice organofosfáty. Interpretace laboratorního vyšetření však musí zohledňovat další faktory, jakými jsou pohlaví, věk, výživa, hormonální faktory nebo ozáření (Bajgar 2009). Diferenciálně diagnosticky je nutno vyloučit možnou otravu karbamáty, která také způsobuje pokles aktivit krevních cholinesteráz se shodnými klinickými symptomy. Pro definitivní potvrzení intoxikace NPL se využívá test reaktivovatelnosti inhibovaných cholinesteráz či detekce noxy nebo jejich metabolitů v organismu (Patočka 2004).

Stanovení aktivity erytrocytární AChE je vhodným markerem pro posouzení klinické závažnosti otravy organofosfáty. Ve srovnání se vstupní hodnotou aktivity AChE poukazuje 40–60% pokles na mírnou intoxikaci, 60–80% pokles na středně těžkou intoxikaci a 80–100% pokles na vážnou, život ohrožující intoxikaci (Ševela 2011). Ze stanovené aktivity erytrocytární AChE lze odvodit také potřebnou dávku atropinu (Thiermann *et al.* 2003, Thiermann *et al.* 2005). Erytropoéza je jediný způsob jakým dochází k obnově erytrocytární AChE po jejím „zestárnutí“. Regenerace probíhá poměrně pomalu; za den se zregeneruje méně než 1 % ireverzibilně inhibované erytrocytární AChE (Eddleston *et al.* 2008).

Aktivita plazmatické BChE je v populaci velmi variabilní a je parametrem náchylnosti k účinku organofosfátů či karbamátů (Sidell 1992, Sidell 1997). Na aktivitu BChE mají vliv faktory genetické, fyziologické, patologické či působení léčiv (Jokanović *et al.* 1996). Gen kódující BChE se vyskytuje v mnoha alelách. Dosud bylo popsáno 75 mutací genu pro BChE, přičemž většina z nich vede k poškození katalytické aktivity enzymu. To zapříčiňuje vážné klinické důsledky při podání xenobiotických substrátů

BChE; podání periferních depolarizujících myorelaxancií, zejména suxamethonia (sukcinylcholinu), způsobuje protrahovanou neuromuskulární blokádu a prolongovanou apnoe (Lushchekina *et al.* 2015).

Stanovení aktivity plazmatické BChE neposkytuje informaci o klinické závažnosti otravy organofosfáty. Může být však nápomocné z forenzního hlediska pro posouzení expozice organofosfáty či karbamáty. Stanovení aktivity plazmatické BChE poskytuje informaci o eliminaci toxinu a o míře zotavení po intoxikaci, díky 7% denní regeneraci inhibované BChE (Cannard 2006, Eddleston *et al.* 2008).

4 Cíle práce

Cílem práce bylo změřit aktivity AChE a BChE v plné krvi zdravých, středoevropských dárců (n = 387) za využití spektrofotometrického stanovení na podkladu Ellmanovy reakce. Cílem bylo vyhodnotit vliv pohlaví, věku a kouření na aktivitu obou cholinesteráz a zpřesnit naměřená data o faktory, které ovlivňují výsledek měření. Těmito faktory byly koncentrace Hb (v případě stanovení AChE) a teplota v průběhu laboratorního měření (v případě stanovení obou cholinesteráz). Dílčím cílem bylo stanovit aktivitu BChE z plazmy a srovnat výstupy měření se stanovením aktivit BChE z plné krve.

Hlavní snahou bylo stanovit průměrné hodnoty aktivit krevních cholinesteráz za fyziologických podmínek a přispět tak k snadnější a rychlejší diagnostice a klasifikaci stavů, u kterých dochází k jejich poklesu.

5 Experimentální část

5.1 Přehled použitého materiálu

Přístroje, chemikálie a roztoky, které byly využity k provedení klinické studie, jsou pro přehlednost uvedeny v **Tab. 1**, **Tab. 2** a **Tab. 3**.

Tab. 1 Použité přístroje

přístroj	výrobce
Spektrofotometr Helios Alpha	Thermo Fisher Scientific, ČR
Průtokový cytometr Cell-Dyn 3200	Abott Laboratories, USA
Univerzální chlazená centrifuga U-320R	Boeco Germany
Vortex-Genie® Mixer	Scientific Industries

Tab. 2 Seznam použitých chemikálií

chemikálie	výrobce
acetylthiocholin jodid (ASCh)	Sigma Aldrich
butyrylthiocholin jodid (BSCh)	Sigma Aldrich
5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoová) kyselina (DTNB)	Sigma Aldrich
ethopropazin hydrochlorid	Sigma Aldrich
huperzin A	Sigma Aldrich
Triton™ X-100	Sigma Aldrich
fosfátový pufr se solemi (PBS), tablety	Sigma Aldrich

Tab. 3 Seznam použitých roztoků

roztok	složení	rozplnění	uchovávání
roztok ASCh (28, 3 mM)	ASCh	82,24 mg	ā 1 ml
	purifikovaná voda	10 ml	-20 °C
roztok BSCh (63,2 mM)	BSCh	200,47 mg	ā 1 ml
	purifikovaná voda	10 ml	-20 °C
roztok DTNB (5mM)	DTNB	396,3 mg	ā 5 ml
	purifikovaná voda	ad 200 ml	-20 °C
roztok ethopropazinu (6 mM)	ethopropazin	20,94 mg	ā 0,5 ml
	HCl (12 mM)	10 ml	-20 °C
roztok huperzinu A (3 mM)	huperzin A	7,27 mg	ā 0,5 ml
	purifikovaná voda	10 ml	-20 °C
hemolyzační roztok	Triton™ X-100	300 μl	
	fosfátový pufr	1000 ml	4 °C
fosfátový pufr (0,1 M; pH 7,4)	tableta PBS		
	purifikovaná voda	200 ml	4 °C

5.2 Popis subjektů a vzorků

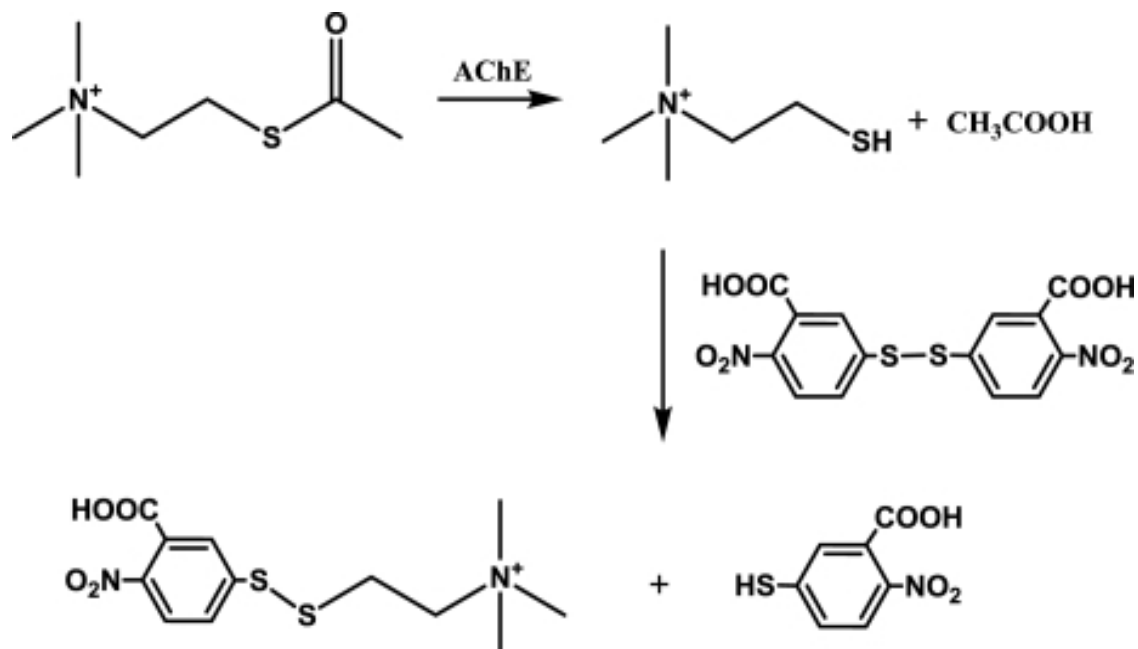
Klinická studie probíhala pod dozorem Etické komise Fakultní nemocnice Hradec Králové, v souladu s národními standardy. Podepsaný informovaný souhlas pacienta byl nezbytným předpokladem pro zapojení do studie, které se zúčastnilo celkem 387 zdravých dárců krve. Pro potřebu klinické studie byly zaznamenány informace o pohlaví dárce, jeho věku a o kuřáctví/nekuřáctví. Věk dárců se pohyboval od 18 do 45 let. Pro statistické zpracování dat byla populace rozdělena do tří věkových kohort: kohorta I, 18–25 let; kohorta II, 25–35 let; kohorta III, 35–45 let. Za kuřáka byl považován člověk, který kouří více než jednu cigaretu týdně.

Vzorek krve byl odebrán podle standardních operačních postupů na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové. Na tomto pracovišti proběhlo také stanovení Hb z plné krve, při zředění 1:218 (v/v), za využití průtokového cytometru Cell-Dyn 3200, Abbott Laboratories, USA. Heparinizovaný vzorek krve byl následně odeslán na Fakultu vojenského zdravotnictví, Katedru toxikologie a vojenské farmacie, Hradec Králové, k vlastnímu stanovení aktivit krevních cholinesteráz. Vzorky plné krve pro stanovení AChE byly připraveny hemolýzou 100 μ l plné heparinizované krve za působení 3900 μ l roztoku TritonuTM X-100. Vzorky plazmy pro stanovení plazmatické BChE byly získány centrifugací části plné heparinizované krve (500 \times g, 10 min, 10 °C) a před vlastním stanovením uchovány při –80 °C.

5.3 Ellmanova metoda

V této studii bylo využito spektrofotometrické stanovení aktivit cholinesteráz založené na principu Ellmanovy reakce. Jedná se o nejužívanější a nejdostupnější metodu stanovení, která využívá enzymatické štěpení esterů thiocholinu, jakožto falešných substrátů. Ellmanova reakce probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku dochází k hydrolyze ASCh působením AChE nebo k hydrolyze BSCh působením BChE. Produktem enzymatického štěpení je příslušný aniont kyseliny (acetát či butyrát) a thiocholin. Ve druhém kroku reaguje thioskupina thiocholinu s disulfidovou vazbou v molekule DTNB (tzv. Ellmanovo činidlo) za současného uvolnění 5-merkpto-2-nitrobenzoové kyseliny (Holas *et al.* 2012). Anionická forma této kyseliny (TNB⁻) vyskytující se při pH 7,4 poskytuje žluté zbarvení, které absorbuje při 412 nm s extinkčním koeficientem $\epsilon = 14150 \text{ l/mol}\times\text{cm}$ a umožňuje tak kolorimetrickou analýzu

(Eyer *et al.* 2003). Ellmanova reakce je znázorněna v **Obr. 6**. Workova modifikace Ellmanovy metody pro stanovení aktivit krevních cholinesteráz v plné krvi byla předlohou pro experimentální část této práce (Worek *et. al* 1999).



Obr. 6 Ellmanova reakce

AChE katalyzuje enzymatickou hydrolýzu ASCh za vzniku thiocholinu a kyseliny octové. Thiocholin uvolňuje z Ellmanova činidla molekulu kyseliny 5-merkpto-2-nitrobenzoové, jejíž aniont TNB⁻ umožňuje kolorimetrické stanovení. Zkratky: ASCh, acetylthiocholin; AChE, acetylcholinesteráza; TNB⁻, aniont kyseliny 5-merkpto-2-nitrobenzoové. Převzato z: Pohanka *et al.* (2011).

5.3.1 Postup měření

Stanovení AChE/BChE z plné krve

Stanovení enzymové aktivity AChE a BChE z plné krve probíhalo vždy v den odběru. K 100 μ l nesrážlivé krve bylo přidáno 3900 μ l hemolyzačního roztoku a vzniklý hemolyzát byl zavortexován. Do plastové kyvety byla pipetována reakční směs složená z 2500 μ l fosfátového pufru (0,1 M; pH 7,4), 200 μ l DTNB (5 mM) a 10 μ l selektivního inhibitoru cholinesterázy. Ethopropazin byl přidáván jako selektivní inhibitor BChE, huperzin A jako selektivní inhibitor AChE. Následovalo přidání 400 μ l hemolyzátu a

protřepání směsi přímo v kyvetě za využití parafilmu. Inkubace směsi po dobu 10 min umožnila kompletní reakci thiocholinu s DTNB, efektivní enzymovou inhibici a ustálení teploty. Ke směsi bylo poté pipetováno 50 μ l specifického substrátu (ASCh při měření enzymové aktivity AChE, BSCh při měření enzymové aktivity BChE). Po přidání specifického substrátu proběhlo okamžitě stanovení při 436 nm po dobu 3 min, za využití spektrofotometru Helios Alpha, Thermo Fisher Scientific, Česká republika. Teplota prostředí byla zaznamenána v době měření. Vzorky byly měřeny ve dvou opakováních.

Stanovení BChE z plazmy

BChE byla stanovena, jak z plné krve za využití huperzinu A jako selektivního inhibitoru AChE, tak z plazmy. Plasma byla získána centrifugací plné nesrážlivé krve (500 \times g, 10 min, 10 $^{\circ}$ C), supernatant byl odebrán a poté skladován až do doby analýzy (-80 $^{\circ}$ C). Reakční směs pro stanovení enzymatické aktivity BChE z plazmy byla tvořena 3500 μ l fosfátového pufru (0,1 M; pH 7,4), 200 μ l DTNB (5 mM) a 10 μ l plazmy, která dosahovala po odmražení pokojové teploty. Po promísení směsi a 10 min inkubaci byl přidán specifický substrát BSCh. Okamžitě bylo zahájeno kolorimetrické stanovení při 436 nm, probíhající po dobu 3 min, za využití spektrofotometru Helios Alpha, Thermo Fisher Scientific, Česká republika. Teplota prostředí byla zaznamenána v době měření. Vzorky byly měřeny v duplikátu. Složení reakční směsi v kyvetě při měření aktivity AChE a BChE, z plné krve i plazmy, stručně shrnuje **Tab. 4**.

Tab. 4 Složení reakční směsi v kyvetě pro stanovení aktivity AChE a BChE v biologickém materiálu

	AChE	BChE	BChE
	(plná krev)	(plná krev)	(plazma)
reakční směs v kyvetě	μl	μl	μl
fosfátový pufr (0,1 M; pH 7,4)	2500	2500	3500
DTNB (5 mM)	200	200	200
huperzin A (3 mM)	–	10	–
ethopropazin (6 mM)	10	–	–
hemolyzát (plná krev: hemolyzační roztok, 1:39)	400	400	–
plazma	–	–	10
10 min inkubace			
ASCh (28,4 mM)	50	–	–
BSCh (63,2 mM)	–	50	50

Zkratky: AChE, acetylcholinesteráza; BChE, butyrylcholinesteráza; DTNB, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoová) kyselina; ASCh, acetylthiocholin; BSCh, butyrylthiocholin.

5.4 Zpracování dat

5.4.1 Korekce dat

Korekce aktivity AChE na Hb

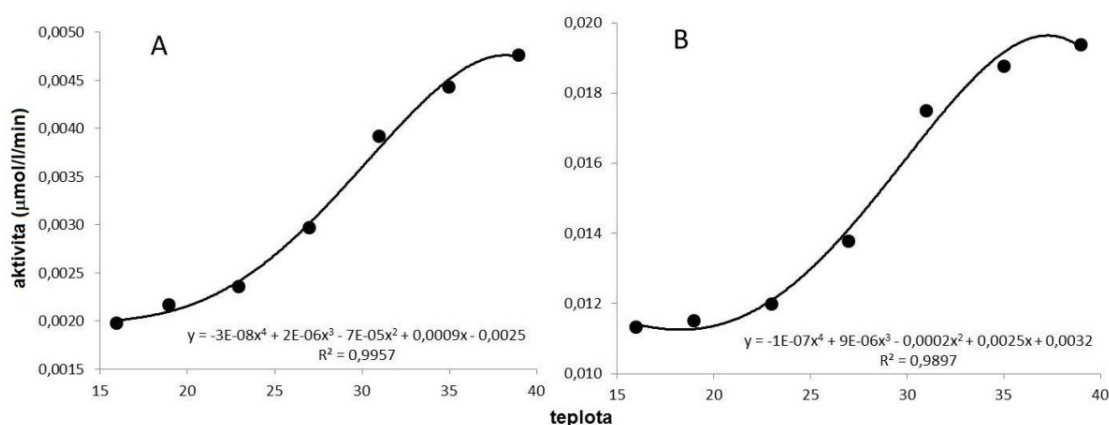
Aktivita AChE je závislá na množství Hb v krvi, která je v populaci velmi variabilní. U všech krevních vzorků byla stanovena koncentrace Hb (g/l). Měření při zředění 1:218 (v/v), probíhalo standardním způsobem, za využití průtokového cytometru Cell-Dyn 3200, Abbott Laboratories, USA. Molekulová hmotnost tetrameru Hb činí 64,000 Daltonů (64,458 g/mol), tudíž 1 g/l Hb odpovídá 0,1551 mmol/l Hb (Beekvelt *et al.* 2001). Tento přepočít byl použit pro přepočít koncentrace Hb z běžných jednotek (g/l) na alternativní jednotky ($\mu\text{mol/l}$), které lze dosadit do vzorce korigujícího aktivitu

AChE vzhledem k Hb. Koeficient 1,174 ve vzorci zohledňuje ředění vzorku během měření koncentrace Hb a během měření aktivity AChE.

$$\text{korekce } \frac{\text{AChE}}{\text{Hb}} = \frac{\text{aktivita AChE } (\mu\text{mol/l/min}) \times 1,174 \times 1000}{\text{Hb } (\mu\text{mol/l})}$$

Korekce aktivity AChE a BChE teplotou

Aktivita obou cholinesteráz úzce korelovala s teplotou během laboratorního měření, která kolísala v rozmezí 21,0 °C až 26,5 °C. Vztah mezi aktivitou enzymů *in vitro* a teplotou byl podložen samostatným experimentem. Při něm se zaznamenávala aktivita AChE v krevním hemolyzátu a aktivita BChE v plazmě při čtyřstupňových intervalech v rozmezí 16 °C až 40 °C. Způsob stanovení aktivit krevních cholinesteráz byl v tomto experimentu shodný se stanovením aktivit krevních cholinesteráz při klinické studii (Tab. 4). Na rozdíl od klinické studie probíhalo měření při dané teplotě vždy ve třech opakováních. Nelineární regresní funkce vyjadřující závislost enzymové aktivity na teplotě je výstupem tohoto experimentu (Obr. 7).



Obr. 7 Závislost aktivity AChE (A) a BChE (B) na teplotě prostředí při *in vitro* stanovení krevních cholinesteráz

Nativní data, částečně zkorigovaná data (podle Hb nebo podle teplot) a plně korigovaná data umožnila srovnat rozdíly v naměřených aktivitách krevních cholinesteráz. Bylo

zjištěno, že aktivita AChE je závislá na koncentraci Hb i na teplotě a pro správnou interpretaci výsledků je nutné zohlednit oba faktory. Aktivita BChE je závislá jen na teplotě a pro získání relevantních výsledků je teplotní korekce nezbytným předpokladem.

5.4.2 Statistické zpracování dat

Statistická analýza dat byla realizována za využití SPSS software (Version 13.0, SPSS Inc, Chicago, IL). Aktivita krevních cholinesteráz ($\mu\text{kat/l}$, $\mu\text{mol/min/Hb}$) byla vyhodnocena ve čtyřech samostatných souborech – nativní data, data po korekci na Hb, data po teplotní korekci a data po korekci oběma faktory. Hodnoty aktivit krevních cholinesteráz byly po logaritmické transformaci vyhodnoceny pomocí faktoriální ANOVY (zohledňující faktory pohlaví, věk a kouření) a následným Post-hoc testem (Tukey test). Vzhledem k výskytu signifikantní interakce mezi faktory (pohlaví \times kouření) byl vliv kouření navíc vyhodnocen v rámci obou pohlaví zvlášť. V případě porušení předpokladu normálního rozdělení byly použity vhodné neparametrické testy (Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test). Výsledky statistických testů byly posuzovány na hladinách významnosti $2\alpha = 0,05$; $0,01$ a $0,001$.

6 Výsledky

6.1 Stanovení hemoglobinu

Průměrná koncentrace Hb ve střeoevropské populaci dosahovala hodnoty $150,0 \pm 0,7$ g/l. Byl zjištěn rozdíl mezi oběma pohlavími ($F_{1,375} = 5,4$; $p < 0,001$). Průměrná koncentrace Hb u mužů činila $159,2 \pm 9,4$ g/l, zatímco u žen $140,0 \pm 8,7$ g/l. Vliv ostatních dvou faktorů (věk a kouření) nebyl prokázán ($F_{1,375} = 1,6$; $p = 0,2$ a $F_{1,375} = 0,2$; $p = 0,7$).

Vzhledem k výskytu signifikantní interakce mezi faktory pohlaví \times kouření ($p = 0,04$) byl vliv kouření vyhodnocen samostatně v rámci obou pohlaví. Koncentrace Hb u mužů kuřáků dosahovala vyšších hodnot než u mužů nekuřáků ($160,7 \pm 1,0$ vs. $158,5 \pm 0,8$ g/l). Naopak tomu bylo u žen; koncentrace Hb u kuřáček dosahovala nižších hodnot než u nekuřáček ($137,9 \pm 1,4$ g/l vs. $140,6 \pm 0,7$ g/l).

6.2 Stanovení aktivit AChE

Pohlaví, věk a kouření jsou hlavní faktory ovlivňující aktivitu AChE v oblasti nativních dat. Korekcí nativních dat ke koncentraci Hb, k teplotě prostředí či k oběma zmíněným faktorům bylo dosaženo zpřesnění naměřených výsledků. Statisticky vyhodnocená data zohledňující vliv jednotlivých faktorů a korekcí jsou pro přehlednost uvedena v **Tab. 5**.

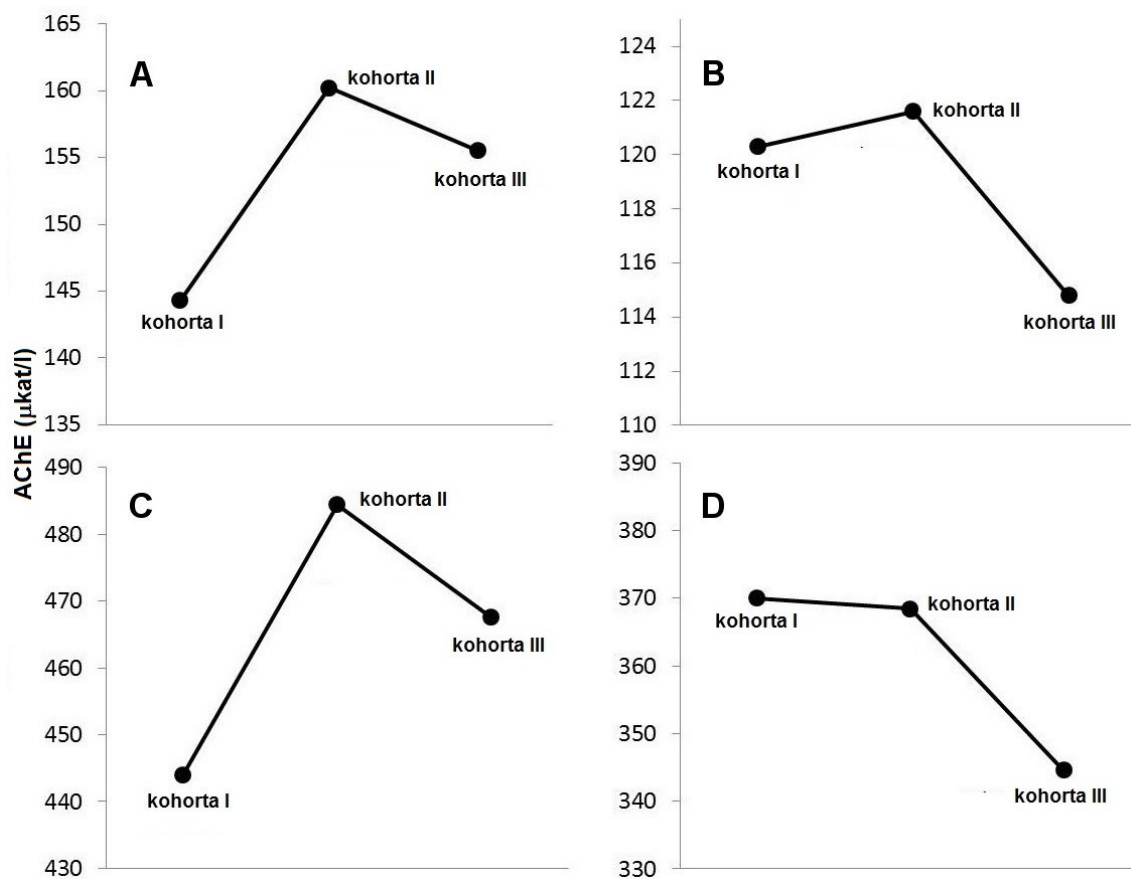
Průměrná hodnota aktivity AChE u zdravé střeoevropské populace dosahovala hodnoty $152,3 \pm 1,4$ μ kat/l v případě nativních dat. Po teplotní korekci byla průměrná aktivita AChE nižší; $119,4 \pm 1,1$ μ kat/l. Po korekci na Hb dosahovala aktivita AChE průměrné hodnoty $463,2 \pm 4,3$; po korekci oběma faktory (teplota, Hb) činila průměrná aktivita AChE $363,4 \pm 3,4$.

Vliv pohlaví na aktivitu AChE byl vyhodnocen jako signifikantní a to jak u nativních dat ($F_{1,375} = 3,8$; $p = 0,05$), tak u dat korigovaných teplotou ($F_{1,375} = 5,2$; $p = 0,02$). V obou těchto případech dosahovali muži o 6 % vyšší aktivity AChE než ženy (pro nativní data $156,7 \pm 2,1$ μ kat/l u mužů vs. $147,6 \pm 1,7$ μ kat/l u žen; pro data korigovaná teplotou $122,8 \pm 1,6$ μ kat/l u mužů vs. $115,8 \pm 1,4$ μ kat/l u žen). Vliv pohlaví na aktivitu AChE byl vyhodnocen také jako signifikantní u dat po korekci na Hb ($F_{1,375} = 17,9$; $p < 0,001$) a u plně korigovaných dat ($F_{1,375} = 12,9$; $p < 0,001$), avšak s opačným

výstupem, vzhledem k signifikantnímu rozdílu v koncentraci Hb u obou pohlaví. V obou těchto případech vykazovali muži téměř o 7 % nižší aktivitu AChE než ženy (pro data po korekci na Hb $448,0 \pm 6,0$ u mužů vs. $479,6 \pm 5,8$ u žen; pro plně korigovaná data $351,0 \pm 4,8$ u mužů vs. $376,7 \pm 4,8$ u žen).

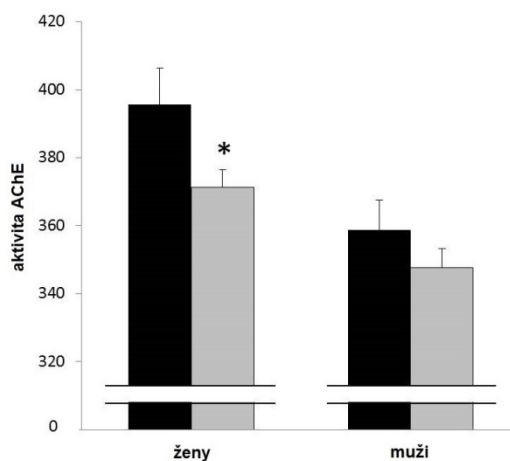
Vliv věku na aktivitu AChE byl vyhodnocen jako signifikantní v případě nativních dat ($F_{2,375} = 17,8$; $p < 0,001$; **Obr. 8A**) a dat po korekci na Hb ($F_{2,375} = 13,5$; $p < 0,001$; **Obr. 8C**). Na základě post-hoc testu dosahovala aktivita AChE signifikantního rozdílu mezi kohortou I a ostatními kohortami ($p < 0,05$), mezi kohortou II a kohortou III nebyl pozorován signifikantní rozdíl ($p > 0,2$). U dat po teplotní korekci (**Obr. 8B**) a u dat po korekci oběma faktory (**Obr. 8D**) se s rostoucím věkem projevil trend k poklesu aktivity AChE, nicméně bez statistické signifikance ($F_{2,375} = 1,3$; $p > 0,05$).

Faktor kouření vykazoval statisticky významný vliv na aktivitu AChE v rámci nativních dat, dat po korekci na Hb a u plně korigovaných dat ($p < 0,05$). Aktivita AChE dosahovala obecně vyšších hodnot u kuřáků než u nekuřáků. Vliv kouření byl výrazný zejména u žen; průměrné aktivity AChE u kuřáček dosahovaly o téměř 8 % vyšších hodnot než u nekuřáček ($p = 0,048$). U mužů byl rozdíl v důsledku kouření méně patrný; průměrné aktivity AChE u kuřáků byly o necelá 3 % vyšší než u nekuřáků ($p = 0,39$). Vliv kouření na aktivitu AChE u obou pohlaví je znázorněn v **Obr. 9**.



Obr. 8 Vliv věku na aktivitu AChE

A, nativní data; B, data po korekci na Hb; C, data po teplotní korekci; D, data po korekci oběma faktory. Kohorta I, 18–25; kohorta II, 25–35; kohorta III, 35–45 let.



Obr.9 Vliv kouření na aktivitu AChE

Kompletně korigovaná data znázorňující rozdíly mezi kuřáky (černé sloupce) a nekuřáky (šedé sloupce). Hodnoty prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka; * p < 0,05.

Tab. 5 Aktivita AChE v plné krvi při zohlednění různých faktorů a korekcí

	počet	typ korekce											
		nativní data (μ kat/l)			data po korekci teplot (μ kat/l)			data po korekci na Hb			data po korekci teplot a Hb		
		mean \pm SEM	median	sig.	mean \pm SEM	median	sig.	mean \pm SEM	median	sig.	mean \pm SEM	median	sig.
celkem	387	152,3 \pm 1,4	149,4	–	119,4 \pm 1,1	116,8	–	463,2 \pm 4,3	452,8	–	363,4 \pm 3,4	354,6	–
muži	200	156,7 \pm 2,1	151,7	*	122,8 \pm 1,6	121,8	*	448,0 \pm 6,0	432,5	***	351,0 \pm 4,8	342,7	***
ženy	187	147,6 \pm 1,7	145,0		115,8 \pm 1,4	112,6		479,6 \pm 5,8	474,9		376,7 \pm 4,8	367,1	
kohorta I	164	144,3 \pm 2,0	140,7	***	120,3 \pm 1,6	117,9		444,0 \pm 6,5	434,7	***	370,0 \pm 5,2	362,9	
kohorta II	130	160,2 \pm 2,3	155,3		121,6 \pm 2,0	117,2	–	484,4 \pm 6,7	473,0		368,4 \pm 6,0	355,5	–
kohorta III	93	155,5 \pm 2,8	154,1		114,8 \pm 2,2	112,5		467,6 \pm 9,0	445,0		344,6 \pm 6,7	336,8	
kuřáci	102	157,6 \pm 2,9	153,3	*	123,8 \pm 2,3	122,0	–	475,2 \pm 8,8	476,5	**	373,9 \pm 7,1	371,3	*
nekuřáci	285	150,5 \pm 1,5	147,0		117,8 \pm 1,2	114,3		459,0 \pm 4,8	446,3		359,6 \pm 3,9	349,4	

Zkratky: SEM, standard error of the mean (střední chyba průměru); sig., signifikance.

6.3 Stanovení aktivit BChE

Hodnoty aktivit BChE naměřené v daném biologickém materiálu (plasma, plná krev) a vliv faktorů pohlaví, věk a kouření jsou pro přehlednost uvedeny v **Tab. 6**.

6.3.1 Stanovení aktivit BChE v plazmě

Aktivita BChE v plazmě dosahovala u zdravé střeoevropské populace průměrné hodnoty $137,7 \pm 2,0 \mu\text{kat/l}$ v případě nativních dat. Po teplotní korekci dat došlo k poklesu na průměrnou hodnotu $125,4 \pm 1,8 \mu\text{kat/l}$.

Naměřené hodnoty BChE se signifikantně lišily v závislosti na pohlaví dárce a to jak u nativních dat, tak i u dat po teplotní korekci ($F_{1,355} = 44,2$; $p = 0,001$ a $F_{1,355} = 45,4$; $p = 0,001$). BChE vykazovala v obou případech o více jak 20 % vyšší aktivitu v mužské populaci než v ženské populaci. Průměrné hodnoty aktivit BChE v oblasti nativních dat činily $154,2 \pm 2,7 \mu\text{kat/l}$ u mužů a $119,3 \pm 2,4$ u žen; v oblasti dat po teplotní korekci byly opět zjištěny hodnoty nižší, $140,2 \pm 2,4 \mu\text{kat/l}$ u mužů a $108,8 \pm 2,2 \mu\text{kat/l}$ u žen.

Aktivita BChE se nelišila mezi jednotlivými věkovými kohortami v případě obou datasetů ($F_{2,355} = 1,7$; $p = 0,2$ a $F_{2,355} = 1,4$; $p = 0,2$), ačkoliv byla s rostoucím věkem pozorována tendence k růstu aktivity BChE. Vliv věku na aktivitu BChE je znázorněn na **Obr. 10A**.

Vliv kouření na aktivitu BChE nebyl vyhodnocen jako signifikantní v případě nativních i korigovaných dat ($F_{1,355} = 1,4$, $p = 0,2$ a $F_{1,355} = 1,1$, $p = 0,3$). Nebyla nalezena žádná interakce ($p > 0,05$) mezi testovanými faktory.

6.3.2 Stanovení aktivit BChE v plné krvi

Stanovení aktivity BChE v plné krvi bylo založeno na využití huperzinu A jako selektivního inhibitoru AChE. Touto metodou byly získány rozdílné hodnoty než v případě stanovení aktivit BChE z plazmy, což bylo dáno rozdílem v ředění vzorku. Výsledky však potvrzují již pozorovaný trend a v případě vyhodnocení průměrných aktivit BChE dosahují rozdíly mezi jednotlivými kohortami statistické významnosti.

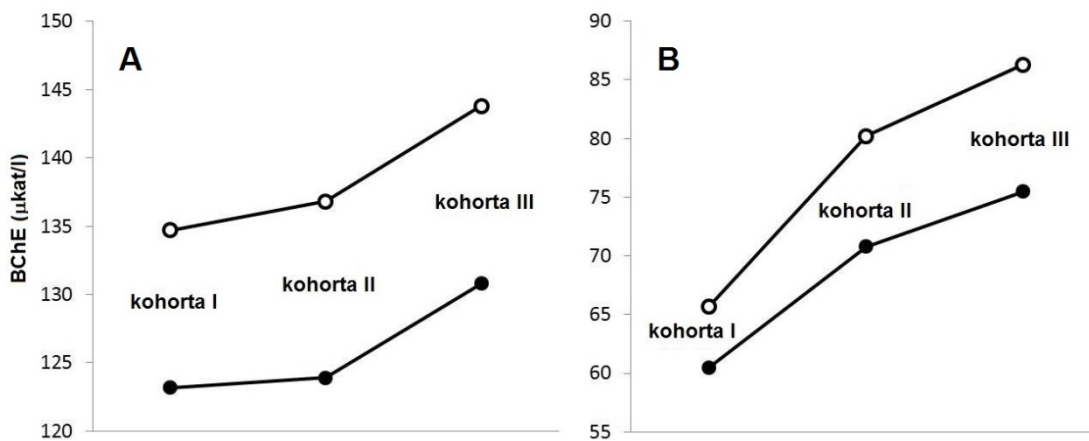
Aktivita BChE dosahovala ve zdravé stredo-evropské populaci průměrných hodnot $75,5 \pm 1,1$ $\mu\text{kat/l}$ v případě nativních dat, u teplotně korigovaných dat pak hodnot nižších, $67,5 \pm 0,8$ $\mu\text{kat/l}$.

Stanovením BChE v plné krvi byl potvrzen signifikantní vliv pohlaví na aktivitu BChE v případě nativních i teplotně korigovaných dat ($F_{1,375} = 9,7$; $p < 0,01$ a $F_{1,375} = 13,5$; $p < 0,001$). Muži dosahovali ve srovnání s ženami vyšších hodnot aktivit BChE v oblasti nativních dat ($79,5 \pm 1,6$ $\mu\text{kat/l}$ vs. $71,2 \pm 1,4$ $\mu\text{kat/l}$) i v oblasti dat po teplotní korekci ($71,0 \pm 1,2$ $\mu\text{kat/l}$ vs. $63,8 \pm 1,1$ $\mu\text{kat/l}$).

Mezi věkovými kohortami byl nově pozorován vysoce signifikantní rozdíl v naměřených hodnotách aktivit BChE ($F_{1,375} = 13,5$; $p < 0,001$, **Obr. 10B**). Mezi kohortou I a kohortou II byl pozorován výrazný, více jak 17% nárůst průměrné hodnoty aktivity BChE ($65,7 \pm 1,5$ $\mu\text{kat/l}$ vs. $80,2 \pm 1,7$ $\mu\text{kat/l}$ v případě nativních dat, $60,5 \pm 1,2$ $\mu\text{kat/l}$ vs. $70,8 \pm 1,4$ $\mu\text{kat/l}$ v případě teplotně korigovaných dat).

Vliv kouření nebyl vyhodnocen jako signifikantní ($p > 0,05$). Nebyla nalezena signifikantní interakce mezi pohlavím, věkem či kouřením u nativních či korigovaných dat.

Výsledné hodnoty BChE, získány oběma způsoby měření, byly srovnány mezi sebou. Korelace poukazuje na dobrou shodu obou metod ($R = 0,6$, $p = 0,01$).



Obr. 10 Vliv věku na aktivitu BChE

Nativní data (prázdné body) a teplotně korigovaná data (plné body) zachycují aktivitu BChE stanovenou z plazmy (A) a z plné krve (B) u jednotlivých věkových kohort. Kohorta I, 18 – 25 let; kohorta II, 25 – 35 let; kohorta III, 35 – 45 let. Zkratky: BuChE, butyrylcholinesteráza.

Tab. 6 Aktivita BChE

	počet	typ korekce					
		nativní data ($\mu\text{kat/l}$)			data po teplotní korekci ($\mu\text{kat/l}$)		
		mean \pm SEM	median	sig.	mean \pm SEM	median	sig.
stanovení BChE z plazmy							
celkem	367	137.7 \pm 2.0	138.3	–	125.4 \pm 1.8	126.8	–
muži	193	154.2 \pm 2.7	154.2	***	140.2 \pm 2.4	139.9	***
ženy	174	119.3 \pm 2.4	119.3		108.8 \pm 2.2	109.7	
kohorta I	150	134.7 \pm 2.8	138.3		123.2 \pm 2.5	125.1	
kohorta II	126	136.8 \pm 3.7	137.5	–	123.9 \pm 3.3	123.7	–
kohorta III	91	143.8 \pm 4.4	143.8		130.8 \pm 3.9	130.6	
kuřáci	94	143.3 \pm 4.3	144.3	–	130.3 \pm 3.8	130.7	–
nekuřáci	273	135.7 \pm 2.3	137.5		123.7 \pm 2.0	125.4	
stanovení BChE z plné krve							
celkem	387	75.5 \pm 1.1	73.9	–	67.5 \pm 0.8	66.7	–
muži	200	79.5 \pm 1.6	79.0	**	71.0 \pm 1.2	71.4	***
ženy	187	71.2 \pm 1.4	69.2		63.8 \pm 1.1	62.7	
kohorta I	164	65.7 \pm 1.5	62.5	***	60.5 \pm 1.2	59.8	***
kohorta II	130	80.2 \pm 1.7	79.4		70.8 \pm 1.4	71.8	
kohorta III	93	86.3 \pm 2.1	85.7		75.5 \pm 1.7	74.8	
kuřáci	102	75.6 \pm 2.2	72.3	–	67.4 \pm 1.0	67.4	–
nekuřáci	285	75.4 \pm 1.2	74.2		67.9 \pm 1.8	66.6	

Zkratky: SEM, standard error of the mean (střední chyba průměru); sig., signifikance.

7 Diskuze

Nejčastěji používanou metodou pro *in vitro* stanovení aktivit krevních cholinesteráz je spektrofotometrické stanovení pomocí Ellmanovy metody. Rychlost stanovení, finanční dostupnost a jednoduchost této metody naráží na mnohá úskalí, která musí být zohledněna během měření. Interference absorpce TNB^- s absorpcí Hb, interakce DTNB s thioley fyziologicky přítomnými v biologickém materiálu, interakce jiných cholinesteráz se substrátem, přítomnost reaktivátorů AChE (oximů) v analyzovaném vzorku a vliv pH jsou hlavní faktory, které mohou výrazně zkreslit výsledek měření (Sinko *et al.* 2007, Holas *et al.* 2012). Při stanovení aktivit AChE je vhodné vztáhnout výsledek měření k hematokritu, množství erytrocytů či Hb. Při stanovení aktivit cholinesteráz (AChE i BChE) je na místě zohlednit vliv teploty, je-li tento údaj k dispozici (Worek *et al.* 1999).

Hlavním úskalím je interference absorpce aniontu TNB^- při svém maximu (412 nm) s absorpcí Hb. Možným řešením je příprava vysoce zředěného vzorku, která však snižuje citlivost měření, nebo měření při odlišné vlnové délce. Velmi výhodné se jeví měření při vlnové délce 436 nm, které snižuje absorpci Hb na 25 %, zatímco absorpce indikátoru dosahuje 80 % svého maxima v porovnání s měřením při 412 nm, při 37 °C (Sinko *et al.* 2007, Holas *et al.* 2012).

Thiolové skupiny v molekulách glutathionu, Hb, albuminu aj. mají tendenci podléhat nežádoucí reakci s Ellmanovým činidlem (DTNB). Nežádoucí vliv těchto sloučenin je eliminován dostatečně dlouhou inkubací hemolyzovaného vzorku s nadbytkem činidla před přidáním thiocholinu jako substrátu a okamžitým měřením. Ke kompletní reakci DTNB s thioley dochází v průběhu 5–6 min (Eyer and Worek 2000).

Pro získání co nejpřesnějšího výsledku je nutné eliminovat katalytické působení cholinesterázy, jejíž aktivita se měřením nehodnotí. V případě AChE lze promýt erytrocyty roztokem PBS za účelem odstranění plazmy, v případě BChE lze vzorek centrifugovat a získat tak plazmu bez příměsí erytrocytů s navázanou AChE. Druhým řešením je selektivní inhibice BChE (při měření aktivity AChE) nebo selektivní inhibice AChE (při měření aktivity BChE), čímž nedochází ke ztrátám, které vznikají při úpravě vzorku za účelem separace obou enzymů.

Hydrolyzu thioesteru jako substrátu může výrazně urychlovat přítomnosti oximů v analyzovaném materiálu. Ellmanova metoda by v tomto případě neměla být metodou volby pro stanovení aktivit krevních cholinesteráz, zvláště v případě, kdy reakce mezi thioesterem a oximem probíhá rychleji než samotná Ellmanova reakce (Sinko *et al.* 2007, Skinjaricspoljar *et al.* 1992).

Enzymatická hydrolyza thiocholinu dosahuje optima při pH 7,6–7,8. Se zvyšující se hodnotou pH dochází snadněji k neenzymatické hydrolyze thioesteru, která může ovlivnit výsledek měření. Z tohoto důvodu by se pH analyzovaného vzorku mělo udržovat na spodní hranici tohoto rozmezí (Bajgar 1972).

Při stanovení aktivit humánních enzymů je doporučená teplota 37 °C. To představuje zvýšené požadavky na laboratorní vybavení (termostat, spektrofotometr se zabudovaným termostatem v prostoru kyvety) a časovou náročnost. V průběhu naší studie byl v samostatném *in vitro* experimentu zjišťován vliv teploty na aktivitu AChE a BChE. Bylo zjištěno, že k největším rozdílům v aktivitách krevních cholinesteráz dochází v intervalu 24–32 °C, což odpovídá laboratorní teplotě za běžných či polních podmínek. Závislost enzymové aktivity na teplotě byla vyjádřena nelineární regresní křivkou s příslušnou rovnicí, což umožňuje teplotní korekci v případě, kdy stanovení aktivit cholinesteráz probíhá při různých teplotách.

Worek *et al.* (1999) publikoval modifikaci Ellmanovy metody, umožňující spolehlivé měření i velmi nízkých aktivit cholinesteráz ve vzorku plné krve. Naše měření probíhalo v souladu s touto validovanou metodou. Vzorek plné krve byl podroben hemolýze za účelem dokonalého uvolnění AChE z erytrocytů. K tomuto účelu byl použit roztok fosfátového pufru a tenzidu TritonTM X-100 dosahující koncentrace 0,01 %, která neovlivňuje spektrofotometrické měření. Příprava hemolyzátu plné krve a měření absorbance při 436 nm vedly ke snížení interference TNB⁻ s Hb. Pro potlačení bočních reakcí thiolů s DTNB došlo k 10 min inkubaci vzorku s činidly, k následnému přidání thiocholinu jako substrátu a k okamžitému měření absorbance nově vznikajícího produktu po dobu 3 min. K potlačení bočních katalytických reakcí ve vzorku plné krve bylo využito huperzin A, jako selektivní inhibitor AChE a ethopropazin jako selektivní inhibitor BChE. Aktivita BChE byla navíc stanovena i z plazmy, po centrifugaci vzorku plné krve. Naměřené, teplotou korigované hodnoty aktivit krevních cholinesteráz byly

v naší studii vztaženy k teplotě 21 °C. Hodnoty aktivity AChE byly vztaženy ke koncentraci Hb.

Jedním z cílů klinické studie bylo vyhodnotit vliv pohlaví, věku a kouření na aktivitu AChE a BChE. U AChE byl pozorován signifikantní vliv pohlaví na hodnotu její aktivity. Pokud při statistickém zpracování dat nebyla zohledněna koncentrace Hb, dosahovali muži o 6 % vyšších hodnot aktivit než ženy. V případě zohlednění koncentrace Hb se ukázal opak; ženy dosahovali o 7 % vyšších aktivit než muži. Zdá se, že fyziologicky nižší množství erytrocytů s navázanou AChE u žen je kompenzováno vyšší enzymatickou aktivitou. Výsledky zároveň dokazují důležitost Hb, coby korekčního faktoru, na interpretaci výsledků. Získané výsledky jsou však v rozporu s dostupnými studii, které neprokázaly signifikantní vliv pohlaví v populaci 18–76 let (průměrný věk 42 let) při stanovení modifikovanou Michel delta pH metodou (Arrieta *et al.* 2009).

Průměrná hodnota aktivity AChE se lišila mezi jednotlivými věkovými kohortami. Pokud byl zanedbán vliv teploty při statistickém zpracování dat, byly pozorovány signifikantní rozdíly mezi kohortou I a kohortou II. V těchto případech dosahovaly aktivity AChE maximálních hodnot u kohorty II (populace mezi 25 – 35 lety). Při zohlednění teplot během korekce dat nebyly pozorovány signifikantní rozdíly mezi kohortou I a kohortou II. U nativních dat či jakýmkoliv způsobem korigovaných dat byly u kohorty III zaznamenány nejnižší hodnoty aktivit AChE, které však nedosahovaly signifikantních rozdílů. Studie, hodnotící aktivity AChE u americké populace ve věku 18–76 let, vyhodnotila vliv věku na aktivitu AChE jako klinicky nesignifikantní (Arrieta *et al.* 2009).

Byla vypořádána vyšší aktivita AChE u kuřáků v porovnání s nekuřáky, která pouze v případě teplotní korekce nedosahovala signifikantních rozdílů ($p = 0,06$). Nárůst aktivit byl zřejmý zejména u žen, u kterých činil rozdíl 8 %. U mužů byl tento rozdíl menší a činil 3 %. Zugno *et al.* (2013) ve své studii na potkanech prokázali, že abúzus cigaret v prenatálním období vedl k nárůstu aktivity AChE i BChE v mozkové tkáni a séru, což zvyšuje pravděpodobnost psychických symptomů v dospělosti. Zvýšené aktivity AChE v důsledku cigaretového kouře byly popsány i v další studii, která dokazuje pozitivní vliv kurkuminu na normalizaci hladin AChE (Jaques *et al.* 2012). Zvýšená aktivita AChE může být možným důsledkem up-regulace nikotinových

acetylcholinových receptorů (nAChR), subtypu $\alpha 4\beta 2$ vlivem cigaretového kouře (Brody *et al.* 2013)

Aktivity BChE stanovené z plazmy dosahovaly přibližně dvojnásobných hodnot než aktivity stanovené z plné krve (průměrná hodnota $125,4 \pm 1,8$ vs. $67,5 \pm 0,8$). Tento nepoměr může být způsoben rozdílnými objemy plazmy v reakční směsi; pro stanovení aktivit BChE z plazmy bylo použito 10 μ l plazmy, pro stanovení aktivit BChE z plné krve bylo použito cca 5 μ l plazmy. Oba způsoby stanovení aktivit BChE (z plazmy, z plné krve) prokázaly shodu v signifikantnosti rozdílů u pohlaví a kouření. U mužů byla vyzorována výrazně vyšší hodnota aktivit BChE než u žen, rozdíl hodnot činil přibližně 20 %. Nebyl prokázán signifikantní vliv kouření na aktivitu BChE. Stanovení BChE z plné krve prokázalo signifikantní vliv věku na hodnotu aktivit. S rostoucím věkem dárce dosahovala aktivita BChE vyšších hodnot. Tento trend však nebyl pozorován v případě stanovení BChE z plazmy.

8 Závěr

Celkem 387 zdravých dárců bylo zapojeno do studie, která stanovila aktivity AChE a BChE v plné krvi a vyhodnotila vliv pohlaví, věku a kouření na hodnotu aktivit cholinesteráz. Tato studie zohlednila faktory zkreslující výsledek měření, kterými jsou koncentrace Hb v případě stanovení aktivity AChE a teplota prostředí v případě obou cholinesteráz. Aktivita BChE byla stanovena jak z plné krve, tak z plazmy, přičemž postup stanovení byl přizpůsoben charakteru biologického materiálu.

Rozsah studie a velikost analyzovaného souboru s dostatečným zastoupením ženské populace umožnil získat hodnotná data, která nachází využití v oblasti toxikologie i medicíny.

Seznam obrázků

Obr. 1 Chemické struktury nervově paralytických látek.....	6
Obr. 2 Reakce organofosfátu s hydroxylovou skupinou serinu v aktivním místě enzymu	7
Obr. 3 Metabolizace tabunu, sarinu, somanu a látky VX v organismu.....	12
Obr. 4 Mechanismus reakce mezi reaktivátorem (pralidoximem) a sarinem inhibované AChE.....	17
Obr. 5 Struktury reaktivátorů AChE.....	19
Obr. 6 Ellmanova reakce.....	27
Obr. 7 Závislost aktivity AChE (A) a BChE (B) na teplotě prostředí při <i>in vitro</i> stanovení krevních cholinesteráz.....	30
Obr. 8 Vliv věku na aktivitu AChE.....	34
Obr. 9 Vliv kouření na aktivitu AChE.....	34
Obr. 10 Vliv věku na aktivitu BChE.....	38

Seznam tabulek

Tab. 1 Použité přístroje.....	24
Tab. 2 Seznam použitých chemikálií.....	24
Tab. 3 Seznam použitých roztoků.....	25
Tab.4 Složení reakční směsi v kyvetě pro stanovení aktivity AChE a BChE v biologickém materiálu.....	29
Tab. 5 Aktivita AChE v plné krvi při zohlednění různých faktorů a korekcí.....	35
Tab. 6 Aktivita BChE.....	39

Zdroje

Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate, butyrate and a method for their determination. *Biochem. J.* 1953;53:110-117.

Antonijević B and Stojiljković MP. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphorus poisoning. *Clin. Med. Res.* 2007;5:71-78.

Arrieta DE, McCurdy SA, Henderson JD, Lefkowitz LJ, Reitstetter R and Wilson BW. Normal range of human red blood cell acetylcholinesterase activity. *Drug Chem Toxicol.* 2009;32(3):182-5.

Bajgar J. Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojenské zdravotnické listy*, XLI. 1972:78-80.

Bajgar J. Bojové otravné látky zneužitelné v civilním sektoru. In: Klement C. *Mimoriadne udalosti vo verejnom zdravotníctve*. PRO, 2011:206-216.

Bajgar J. Central and peripheral nervous system: effects of highly toxic organophosphates and their antidotes. *Research Signpost*, Kerala, 2009.

Bajgar J and Voicu V. Assessment of effective dose of nerve agents following different routes of administration. *Therap. Pharmacol. Clin. Toxicol.* 2009;13:131-138.

van Beekvelt MC, Colier WN, Wevers RA, Van Engelen BG. Performance of near-infrared spectroscopy in measuring local O₂ consumption and blood flow in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001;90(2):511–519.

Berkenstadt H, Marganitt B, Atsmon J. Combined chemical and conventional injuries – pathophysiological, diagnostic and therapeutic aspects. *Isr. J. Med. Sci.* 1991;27:623-6.

Black RM, Harrison JM and Read RW. The interaction of sarin and soman with plasma proteins: the identification of a novel phosphorylation site. *Arch. Toxicol.* 1999;73:123-126.

Brody AL, Mukhin AG, Shulenberger S, Mamoun MS, Kozman M, Phuong J, Neary M, Luu T and Mandelkern MA. Treatment for tobacco dependence: effect on brain

nicotinic acetylcholine receptor density. *Neuropsychopharmacology* 2013;38:1548-1556.

Brody TM. *Human pharmacology: molecular to clinical*. 1995. upřesnit kapitolu v knize.

Carletti E, Schopfer LM, Colletier JP, Froment MT, Nachon F, Weik M, et al. Reaction of cresyl seligenin phosphate, the organophosphorus agent implicated in aerotoxic syndrome, with human cholinesterases: mechanistic studies employing kinetics, mass spectrometry and X-ray structure analysis. *Chem. Res. Toxicol.* 2011;24(6):797-808.

Cannard K. The acute treatment of nerve agent exposure. *J. Neurol. Sci.* 2006;249:86-94.

Chatonenet A and Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J.* 1989;260(3):625-634.

Coleman K. *A History of Chemical Warfare*. Macmillan, New York, 2005.

De Jong LPA, Benschop HP, Van Den Berg GR, Wolring GZ, Korte DC. Reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase by 1-(hetero)arylmethyl-pyridinium-oximes. *Eur. J. Med. Chem.–Chim Therap.* 1981;16:257-262.

Doctor BP, Maxwell DM, Ashani Y, Saxena A, Gordon RK. New approaches to medical protection against chemical warfare nerve agents. In: Somani SM et al. *Chemical Warfare Agents: Toxicity at Low Levels*. CRC Press, 2001:191-212.

Eddleston M, Buckley NA, Eyer P and Dawson AH. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* 2008; 371:597-607.

Emerick GL, DeOliveira GH, dos Santos AC and Ehrich M. Mechanism for consideration for intervention in the development of organophosphorus-induced delayed neuropathy. *Chem. Biol. Interact.* 2012; 199(3):177-184.

EPA. *EPA Chemical Profile on Sarin; Tabun*. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1985c.

Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglun A, Simeon-Rudolf V and Reiner E. Molar absorption coefficients for the reduced ellman reagent: Reassessment. *Anal. Biochem.* 2003;312:224-227.

Eyer P, Worek F. The determination of human erythrocyte acetylcholinesterase (Ery AchE) in a modified Ellman assay. Proc. CB Medical Treatment Symposium 2000. Walther-Straub Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LudwigMaximilians-Universität München, Germany, 1-6.

Feldman RG. Organophosphorus compounds. In: Feldman RG. Occupational and Environmental Neurotoxicology. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999:442-465.

Fonnum F and Sterri SH. Factors modifying the toxicity of organophosphorus compounds including soman and sarin. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1981;1:337-352.

Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* 1990;87:245-54.

Ghanem E, Raushel FM. Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005;207(2):459-470.

Gupta RC. Handbook of Toxicology of Warfare Agents. Elsevier/AP, 2009.

Halámek E and Koblíha Z. Potenciální bojové chemické látky. *Chem. Listy.* 2011;105:323-333.

Holas O, Musilek K, Pohanka M and Kuča K. The progress in the cholinesterase quantification methods. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2012 Sept;1-17.

Hoskins B, Fernando JC, Dulaney MD. Relationship between the neurotoxicities of soman, sarin and tabun, and acetylcholinesterase inhibition. *Toxicol. Lett.* 1986; 30:121-9.

Jaques JA, Rezer JF, Carvalho FB, da Rosa MM, Gutierrez JM, Gonçalves JF, Schmatz R, de Baires AV, Mazzanti CM, Rubin MA, Schetinger MR and Leal DB. Curcumin protects against cigarette smoke-induced cognitive impairment and increased acetylcholinesterase activity in rats. *Physiol Behav.* 2012 Jul 16;106(5):664-9.

Jamal GA. Neurological syndromes of organophosphorus compounds. *Advers Drug. React. Toxicol. Rev.* 1997;16:133-170.

Johnsom MK and Vale JA. Clinical management of acute organophosphate poisoning: an overview. In: Ballantyne B and Marrs TC. *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates.* London: Butterworth, 1992:528-534.

Jokanović M, Kosanović M and Maksimović M. Interaction of organophosphorus compounds with carboxylesterases in the rat. *Arch. Toxicol.* 1996; 70:444-450.

Jokanović M. Metabolism of Warfare Nerve Agents. In: Gupta RC. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Elsevier/AP, 2009: 800.

Jun D, Musilova L, Musilek K and Kuca K. In vitro ability of currently available oximes to reactivate organophosphate pesticide-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Int J Mol Sci.* 2011;12(3):2077-87.

Kadar T, Raveh L, Cohen G, Oz N, Baranes I, Balan A, Ashani Y and Shapira S. Distribution of ³H-soman in mice. *Arch. Toxicol.* 1985;58:45-49.

Karalliedde L, Baker D and Marrs TC. Organophosphate-induced intermediate syndrome: etiology and relationships with myopathy. *Toxicol. Rev.* 2006; 25(1): 1-14.

Kassa J, Krs O, Cabal J. *Základy vojenské toxikologie a ochrany proti BCHL pro posluchače VLA JEP farmaceutického směru*. Hradec Králové: Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, 1992.

Kassa J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2002;6:803-816.

Kassa J, Musílek K, Karasová J, Kuča K, Bajgar J. Two possibilities how to increase the efficacy of antidotal treatment of nerve agent poisoning. *Mini Rev. Med. Chem.* 2012;12:24-34.

Kassa J. *Základy vojenské toxikologie a ochrany proti bojovým chemickým látkám role 1 – 4*. Hradec Králové: Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, 2003.

Kuča K, Cabal J, Patočka J, Dohnal V. Quaternary heteroarenium salts as the competitive inhibitor of the brain acetylcholinesterase. *Lett. Drug Des. Disc.* 2004b;1:97-100.

Kuča K, Jun D, Musilek K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini Rev Med Chem.* 2006;6(3):269-77.

Kuča K, Kassa J. Oxime-induced reactivation in rat brain acetylcholinesterase by pyridinium oximes. *Hum. Exp. Toxicol.* 2004a;23:167-171.

Kuča K, Musilek K, Jun D, Bajgar J and Kassa J. Novel oximes. In: Gupta RC. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. Elsevier/AP, 2009:1000.

Kuča K, Patočka J, Cabal J. Reactivation of organophosphate inhibited acetylcholinesterase activity by alpha,omega-bis-(4-hydroxyiminomethylpyridinium) alkanes in vitro. J Appl Biomed. 2003;1:207-211.

Lamka J and Ducháček. Veterinární léčiva pro posluchače farmacie. Praha: Karolinum,1998:77.

Li B, Nachon F, Fromet MT, Verdier L, Debouzy JC, Brasme B, Gillon E, Schopfer LM, Lockridge O and Masson P. Binding and hydrolysis of soman by human serum albumin. Chem. Res. Toxicol. 2008;21:421-431.

Little PJ, Reynolds ML and Bowman ER. Tissue disposition of ³H sarin and its metabolites in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1986;83:412-419.

Lundy PM, Raveh L, Amitai G. Development of the bisquarternary oxime HI-6 toward clinical use in the treatment of organophosphate nerve agent poisoning. Toxicol. Rev. 2006;26:231-243.

Lushchekina S, Delacour H, Lockridge O and Masson P. Human butyrylcholinesterase polymorphism: Molecular modeling. Int J Risk Saf Med. 2015;27(1):80-81.

Masson P, Josse D, Lockridge O, Viguie N, Taupin C, Buhler C. Enzymes hydrolyzing organophosphates as potential catalytic scavengers against organophosphate poisoning. J. Physiol. 1998;92:357-362.

Masson P and Rochu D. Catalytic Bioscavengers: The Next Generation of Bioscavenger-Based Medical Countermeasures. In: Gupta RC. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. Elsevier/AP, 2009:1053-1066.

Mesulam M, Guillozet A, Shaw P and Quinn B. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. Neurobiology of Disease 2002;9(1):88-93.

Milatović D and Jokanović M. Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators in the Treatment of OP Poisoning. In: Gupta RC. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. Elsevier/AP, 2009:985-966.

Munro NB, Ambrose KR and Watson A. Toxicity of the Organophosphate Chemical Warfare Agents GA, GB, and WX: Implications for Public Protection. *Environmental Health Perspective* 1994;102(1):18-37.

Musilek K, Holas O, Horová A, Pohanka M, Žďárová Karasová J, Jun D, Kuča K. Progress in Antidotes (Acetylcholinesterase Reactivators) Against Organophosphorus Pesticides. In: Stoytcheva M. *Pesticides in the Modern World – Effects of Pesticides Exposure*. InTech, 2011:341-350.

Nakajima T, Sasaki K, Ozawa H, Sekijima Y, Morita H, Fukushima Y and Yanagisawa N. Urinary metabolites of sarin in a patient of the Matsumoto sarin incident. *Arch. Toxicol.* 1998;72:601-603.

Patočka J et al. *Vojenská toxikologie*. Grada, 2004. 1998;4:71-8.

Pfaff BL. Emergency department management of nerve agents exposure. *Int. J. Trauma Nursing*

Plageman LR, Pauletti GM and Skau KA. Characterization of acetylcholinesterase in caco-2 cells. *Exp. Biol. Med.* 2002;227:480-486.

Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap.* 2011;155:219-229.

Pohanka M, Hrabínová M, Kuča K and Simonato JP. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxyl acetate and comparison with the standard Ellman's method. *Int J Mol Sci.* 2011;12(4):2631-2640.

Rakonczay Z. Cholinesterase and its molecular forms in pathological states. *Progr. Neurobiol.* 1988(31):311–330

Richardson RJ. Interactions of organophosphorus compounds with neurotoxic esterase. In: Chambers JE, Levid PE eds. *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects*. Academic Press, San Diego, 1992:299-323.

Richardson RJ, Worden M, Makhaeva GF. Biomarkers and Biosensors of Delayed Neuropathic Agents. In: Gupta RC. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Elsevier/AP, 2009:863.

Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Review* 1987;87:955-79.

Santarpia L, Grandone I, Contaldo F and Pasanisi F. Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *Journal List, J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2013;4(1):31-39.

Saxena A, Doxtor BP, Sun W, Luo C, Bansal R, Naik RS. HuBChE: a bioscavenger for protection against organophosphate chemical warfare agents. *U.S. Army Medical Department J.* 2004:22-29.

Scott L. Pretreatment for nerve agent poisoning. In: Marrs TC, Maynard RL, Sidell FR. *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*, 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd. 2007:343-353.

Sellström A. Anticonvulsants in anticholinesterase poisoning. In: Ballantyne B, Marrs TC. *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Butterworth-Heinemann, 1992: 578-86.

Shih ML, McMonagle JD and Dolzine W. Metabolites pharmacokinetics of soman, sarin and GF in rats and biological monitoring of exposure to toxic organophosphorus agents. *J. Appl. Toxicol.* 1994;14:195-199.

Sidell FR. Clinical considerations in nerve agent intoxication. In: Somani SM. *Chemical Warfare Agents*, Academic Press, San Diego, 1992:155-194.

Sidell FR. Chemical agent terrorism. *Ann. Emerg. Med.* 1996;28:223-224.

Sidell FR. Nerve agents. In: *Medical Aspects of of Chemical and Biological Warfare*. Office of the Surgeon General, Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC, 1997:129-179.

Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR. *Textbook of Military Medicine: Medical aspects of Chemical and Biological Warfare*. TMM Publications, Washington DC, 1997.

Sinko G, Calic M, Bosak A, Kovarik Z. Limitation of the ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Anal Biochem*, 2007;370:223-227.

Skrinjaricpoljar M, Franciskovic L, Radic Z, et al. Reaction of imidazolium and pyridinium oximes with the cholinesterase substrate acetylthiocholine. *Acta Pharmaceut* 1992;42:77-83.

Sterri SH, Fonnum F. Role of Carboxylesterases in Therapeutic Intervention of Nerve Gas Poisoning. In: Gupta RC. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Elsevier/AP, 2009: 1033-10039.

Švela K, Ševčík P. Akutní intoxikace a léková poškození v intenzivní medicíně. Grada, 2011:101-116.

Tan DH, Peng SQ, Wu YL, Wang YM, Lu CF and Yan CH. Chronic organophosphate (OP)-induced neuropsychiatric disorder is a withdrawal syndrome. *Med Hypotheses* 2009;72(4):405-406.

Taylor P. Anticholinesterase agents. In: Bruton LL, Chabner BA, Knollmann BC. Goodman and Gilman's *The Pharmacological basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York, 1996:161-167.

Taylor P and Radić Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1994;34:281-320.

Thiermann H, Worek F and Szinicz L. On the atropine demand in organophosphate poisoned patients. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2003;41:457.

Thiermann H, Szinicz L, Eyer P, Zilker T and Worek F. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chem. Biol. Interact.* 2005;157-158:345-347.

Tucker JB. *War of Nerves: Chemical Warfare from World War I to al-Qaeda*. Pantheon Books, New York, 2006.

Van Helden HP and Wolthius OL. Evidence for an intramuscular depot of the cholinesterase inhibitor soman in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1983;89:271-274.

Voicu VA, Thiermann H, Radulescu FS, Mircioiu C and Miron DS. The Toxicokinetics and Toxicodynamics of Organophosphates versus the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oxime Antidotes: Biological Consequences. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 2010;106(2):73-85.

Yang CC and Deng JF. Intermediate syndrome following organophosphate insecticide poisoning. *J Chin Med Assoc.* 2007;70(11):467-472.

Williams NH, Harrison JM, Read RW and Black RM. Phosphylated tyrosine in albumine as a biomarker of exposure to organophosphorus nerve agents. *Arch. Toxicol.* 2007;81:627-639.

Wolthius OL, Vanwersch RA, Van Helden HP. Residual behavioral incapacitation after therapy of soman intoxication: the effect of soman simulator. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1990;8:127-30.

Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta.* 1999;288(1-2):73-90.

Zhang Q, Li A, He S, Yao X, Zhu J, Zhang Z, Sheng Z and Yao Y. Serum total cholinesterase activity on admission is associated with disease severity and outcome in patients with traumatic brain injury. *Plos One.* 2015;10(6):e0129082.

Zhukovskii YG. On establishment of individuality of the cholinesterase enzyme in the studied preparation. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2003;39:281-290.

Zugno AI, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, Cipriano AL, Oliveira MB, Heylmann AS, Budni J, Souza RP and Quevedo J. Chronic exposure to cigarette smoke during gestation results in altered cholinesterase enzyme activity and behavioral deficits in adult rat offspring: potential relevance to schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2013 Jun;47(6):740-6.