

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra farmakologie a toxikologie

**HODNOCENÍ EFEKTIVITY OXIMOVÝCH  
REAKTIVÁTORŮ ACETYLCHOLINESTERÁZY NA  
ZÁKLADĚ NEUROBEHAVIORÁLNÍCH METOD**

(Rigorózní práce)

ve spolupráci s  
UNIVERZITOU OBRANY V BRNĚ  
FAKULTOU VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedrou toxikologie

Školitelé: Prof. MUDr. Jiří Kassa, CSc.  
PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

## **OBSAH:**

<b>1 Abstrakt</b>	<b>4</b>
<b>2 Úvod do řešení problematiky</b>	<b>5</b>
2.2 Zástupci NPL a jejich charakteristika	6
2.2.1 Základní zástupci NPL	6
2.2.2 Fyzikálně – chemické vlastnosti	8
2.2.3 Využití látek obdobných struktur v jiných odvětvích	9
2.3 Charakteristika NPL užitých v pokusu	11
2.4 Farmakokinetická charakteristika	12
2.5 Farmakodynamická charakteristika	13
2.5.1 Acetylcholin	14
2.5.2 Acetylcholinové receptory	15
2.5.3 Acetylcholinesteráza	16
2.5.4 Interakce AChE a NPL	19
2.6 Problematika intoxikace NPL	20
2.6.1 Klinický obraz akutní intoxikace	20
2.6.2 Pozdní neurotoxický efekt	23
2.7 Problematika terapie otrav NPL	24
2.7.1 Nеспецифická terapie otrav NPL	24
2.7.2 Funkční antidota v terapii otrav NPL	25
2.7.3 Kauzální antidota v terapii otrav NPL	26
2.7.4 Další možnosti doplnění terapie	28
<b>3 Materiál a metody</b>	<b>30</b>
3.1 Zvířata	30
3.2 Chemikálie	30
3.3 Metodika	33
3.3.1 Funkční observační baterie	33
3.3.2 Vlastní provedení pokusu	38
3.3.3 Statistické hodnocení	38
<b>4 Výsledky</b>	<b>40</b>
4.1 Experiment číslo 1	40
4.2 Experiment číslo 2	43
4.3 Experiment číslo 3	45
<b>5 Diskuse</b>	<b>48</b>
<b>6 Závěr</b>	<b>56</b>
<b>7 Poděkování</b>	<b>58</b>
<b>8 Seznam použité literatury</b>	<b>59</b>
<b>9 Příložená literatura</b>	<b>67</b>

## SEZNAM ZKRATEK UŽITÝCH V TEXTU:

A	atropin
AČR	Armáda České Republiky
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChRs	acetylcholinové receptory
BuChE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervový systém
GA	tabun
GB	sarin
GD	soman
GF	cyklosarin
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
CHZ	chemické zbraně
i.m.	intramuskulární způsob aplikace látky
i.v.	intravenózní způsob aplikace látky
LD <sub>50</sub>	střední letální dávka
mAChRs	muskarinové acetylcholinové receptory
nAChRs	nikotinové acetylcholinové receptory
NPL	nervově paralytická látka
NT	neurotransmitter
OFI	organofosforové insekticidy
OL	otravná látka
p.o.	perorální způsob aplikace látky

## **1 ABSTRAKT:**

Na albinotických samcích potkanů kmene Wistar byla hodnocena schopnost oximových reaktivátorů enzymu acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) eliminovat projevy neurotoxicity navozené nervově paralytickými látkami *in vivo*. Ve dvou pokusech byl zvířatům podán i.m. tabun, ve třetím soman, vždy v dávce 80 % LD<sub>50</sub> a po uplynutí 1 minuty byla podána i.m. terapie obsahující anticholinergikum atropin (21 mg/kg) vždy v kombinaci s jedním z vybraných oximů. Do pokusů byly zařazeny nově syntetizované látky KO74 a KO75, dále pak obidoxim, trimedoxim a HI-6 jako srovnávací látka. Všechny testované látky byly v průběhu všech pokusů aplikovány v ekvimolárních dávkách (50 μmol/kg).

Pro hodnocení jednotlivých projevů tabunem navozené neurotoxicity byla použita metodika Funkční pozorovací baterie, která obsahuje hodnocení sensorických, motorických a autonomních nervových funkcí. Jednotlivé ukazatele navozené neurotoxicity budou hodnoceny 24 hodin a 7 dní po intoxikaci a porovnávány s daty kontrolní skupiny, které byl i.m. podán namísto nervově paralytických látek a antidot fyziologický roztok.

Cílem tohoto souboru pokusů je prokázat pozitivní terapeutický efekt testovaných reaktivátorů AChE a hodnotit parametry účinnosti jednotlivých terapeutických kombinací. V prvním z experimentů byla pozornost zaměřena hlavně na stanovení terapeutické účinnosti nově syntetizovaných látek typu oximů KO74 a KO75, v následném pak byl efektivnější z nich znovu testován. V posledním z řady pokusů jsme hodnotili účinek těchto oximů vůči otravě jinou nervově paralytickou látkou, somanem.

## **2 ÚVOD DO ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY:**

Organické sloučeniny obsahující ve své molekule fosfor, k nimž jsou řazeny i nervově paralytické látky (NPL), mají širokou biologickou aktivitu, která zahrnuje projevy mutagenní (triethylfosforamid), teratogenní a karcinogenní (cyklofosfamid), nefrotoxické (dimetylfosfát), myelotoxické nebo pneumotoxické. Některé z těchto látek poškozují pankreas a varlata (tri-*o*-kresylfosfát), další mohou ovlivnit psychomimeticky nervový systém (psilocibin) nebo mít účinky depresivní (trietylfosfát) (Bajgar 2004).

Organofosforové sloučeniny však také hrají velmi významnou roli v živých organismech, v proteosyntéze, metabolismu a dalších syntetických reakcích. Jsou také důležitou součástí nukleových kyselin a enzymatických systémů, jako koenzymy. Organické fosfáty jsou také důležité v energetickém metabolismu (ATP, fosforylované sacharidy), dále jsou pak důležité v roli neuromediátorů (Bajgar 2004).

První látky s nervově paralytickým účinkem byly syntetizovány chemikem Schraderem, který v roce 1935 popsal při výzkumu nových insekticidů významné toxické účinky u *N, N*-dimethylamidofosforyl fluoridu (Bajgar 1996). Schraderův výzkum později vedl k cílené syntéze NPL (Prymula 2002).

Problematika otravných látek, tedy také NPL, je v této době opět velmi aktuální. Některé státy stále vlastní obrovská množství chemické munice obsahující NPL. Jedná se o staré zásoby, které nejsou určeny k použití a mají být likvidovány. I přes existenci celosvětové Úmluvy o zákazu chemických zbraní hrozí jejich zneužití kdekoli ve světě a to nejen na poli válečném (Kunešová 2005). Je známo, že sovětská armáda zneužívala chemické zbraně v Afganistanu. Události na Blízkém východě v letech 1980–1988 (irácko – iránská válka) i 1990–1991 (válka v zálivu – Gulf War) potvrdily, že se nejedná pouze o velmoce (Prokeš 2005).

Vzhledem k jejich velmi snadné syntéze a použití mohou být tyto látky zneužity i různými teroristickými skupinami. První teroristický útok NPL proti civilnímu obyvatelstvu byl zaznamenán v roce 1994 v Matsumotu (Japonsko) a o jeden rok později také v Tokiu (Morita 1995, Ohbu 1997). Při útoku sarinem v stanici podzemní dráhy bylo těmito látkami poškozeno přes tisíc lidí a dvanáct zemřelo (Nagao 1997).

Vzhledem k těmto skutečnostem a současné mezinárodní politické situaci i historickým zkušenostem je kladen velký tlak na výzkum vojensky použitelných chemických zbraní a vývoj léčebných prostředků proti jejich účinkům.

## **2.1 Zástupci NPL a jejich charakteristika:**

### **2.1.1 Základní zástupci NPL:**

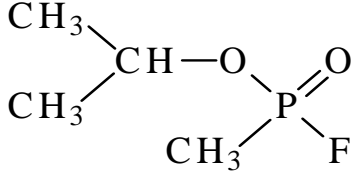
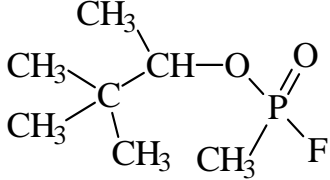
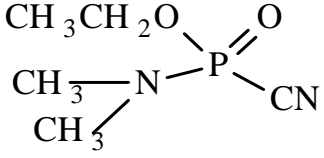
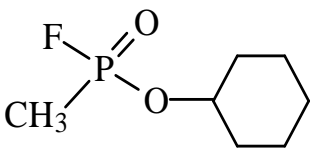
NPLse vyznačující vysokou toxicitou vůči teplokrevným organismům, a tedy i savcům. Pro svou jednoduchou výrobu, snadnou použitelnost a rychlý nástup účinků patří k nejvíce nebezpečným bojovým chemickým látkám. Dělí se na dvě skupiny, které jsou obecně označovány jako G látky a V látky.

Organofosforové látky, které jsou velmi efektivní inhibitory cholinesteráz, vyhovují tzv. Schraderovu pravidlu čtyř substituentů. Které říká, že vysokou inhibiční účinnost budou mít látky se čtyřmi různými substituenty na atomu fosforu, přičemž jeden z těchto substituentů bude při nukleofilním ataku snadno odstupovat (Schrader 1950).

Skupina těchto látek je označována jako G–série NPL, protože byly syntetizovány německými vědci (German scientists) (Bajgar 1996). Jako první byl připraven tabun (GA: O–ethyl dimethylamidokyanofosfát) v roce 1936. Sarin (GB: O–isopropyl-methylfluorofosfonát) byl poprvé syntetizován v roce 1938, následoval

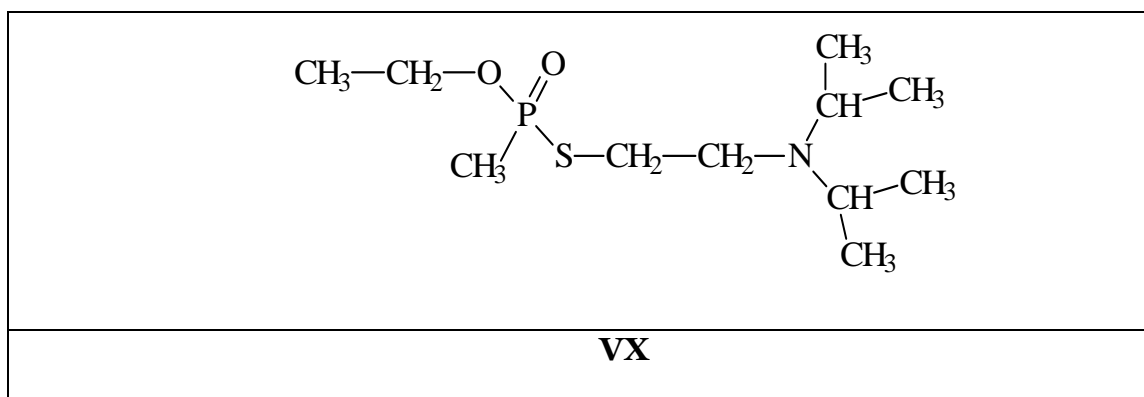
soman (GD: *O*-pinakolyl-methylfluorofosfonát) v roce 1944 (Koelle 1963). Soman byl již připraven na podkladě farmakologického testování, jedná se o toxičtější analog sarinu. Jako poslední byl připraven cyklosarin (GF: cyklohexylmethylfluorofosfonát) v roce 1949 (Bajgar 1996).

**Tabulka 1:** Struktury vojenských organofosforových sloučenin, G serie:

	
<b>Sarin</b>	<b>Soman</b>
	
<b>Tabun</b>	<b>Cyklosin</b>

Takzvaná V – série, která zahrnuje látku VX byla syntetizována později (Zajtchuk 1997). Byla připravena na základě tajně získaných německých materiálů po rozsáhlých farmakologických a chemických studiích Američany a Brity (Prymula 2002). Vývoj nových OL s nervově paralytickým účinkem byl po roce 1945 orientován především na zvýšení toxicity a permeability neporušeným kožním povrchem. Největšího vojenského významu dosáhla látka VX: *O*-ethyl-*S*-(2-diisopropylaminoethyl)methylthiofosfonát. VX je dodnes nejtoxičtějším známým organofosfátem pro člověka (Prokeš 2005).

**Tabulka 2:** Struktura vojenských organofosforových sloučenin, V serie:



### 2.1.2 Fyzikálně – chemické vlastnosti:

Látky řazené do G serie můžeme charakterizovat jako bezbarvé kapaliny podobné vodě. I ve vyšších koncentracích mají prakticky zanedbatelný zápach, pouze sarin se vyznačuje slabou vůní po ovoci (Kassa 1993). Jsou rozpustné ve vodě a dobře v organických rozpouštědlech. Je pro ně charakteristická vysoká těkavost, takže nejpravděpodobnější branou vstupu do organismu jsou dýchací cesty (Patočka 2004a).

Látka VX je bezbarvá, méně pohyblivá kapalina bez výraznějšího zápachu. Ve vodě je špatně rozpustná, dobře v organických rozpouštědlech a tucích. Je pro ni charakteristická nízká těkavost, takže zamoří terén i vodu na dlouhou dobu, v zimě až na dobu 16 týdnů (Kassa 1993).

Orgánofosfáty mají vysokou lipofilitu, velmi snadno se vstřebávají a prostupují všemi bariérami včetně neporušené kůže (kontaktní jedy – V-látky) (Lincová 2002). Při absorpci a penetraci jednotlivými tkáněmi nevyvolávají žádné závažnější morfologické změny (Kassa 1993). Intoxikace organismu se vyvíjí velmi rychle, k úmrtí může dojít i během několika minut.



### **2.1.3 Využití látek obdobných struktur v jiných odvětvích:**

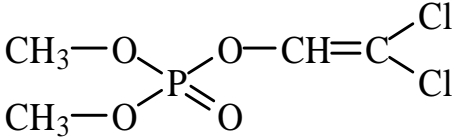
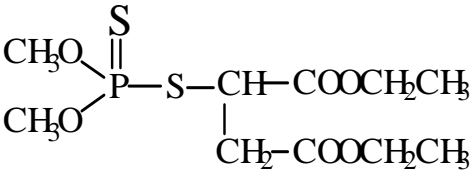
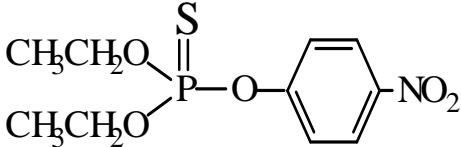
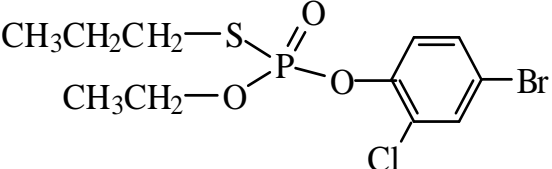
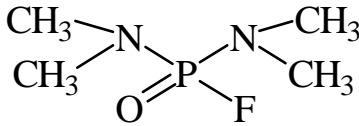
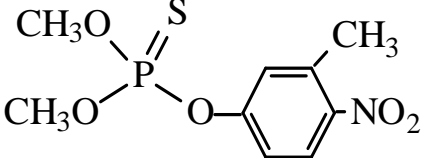
Sloučeniny stejné základní struktury jsou běžně používány i v jiných odvětvích. Jsou to čteně užívané technologicky pomocné látky v průmyslu, hlavně pak jako změkčovadla, hydraulické kapaliny, lubrikační aditiva, plastifikátory a antioxidanty.

Organické deriváty fosforu byly v minulosti často užívány k veterinárním účelům. V dnešní době jsou již používána pouze dvě léčiva z této skupiny. Metrifonát je léčivem endoparazitálních i ektoparazitálních infekcí zvířat (Lamka 1998). Druhým léčivem je pak Dichlorvos, užíván je jako endoparazitikum.

Nejširšího použití dosáhly tyto látky v zemědělství jako pesticidy, kde jsou dnes běžně dostupné (Patočka 2004a). Pesticidy začaly být ve větším měřítku používány od 2. světové války. Organické sloučeniny fosforu, zásluhou vysoké účinnosti, nahradily méně toxické chlorované uhlovodíky. Skupina organofosfátů se liší od chlororganických pesticidů rychlým rozpadem, takže nedochází ke kumulaci v životním prostředí a organismech. V zemích, kde se pesticidy tohoto typu používají, zapříčiňují každoročně velký počet profesionálních, suicidálních i náhodných otrav (Vopršalová 1996).

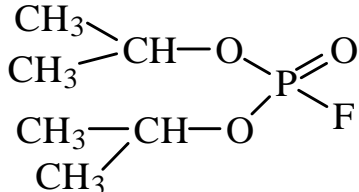
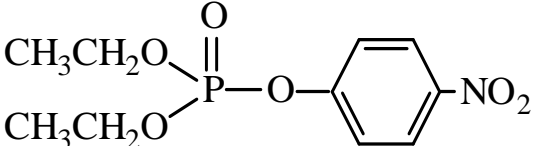
Otravy organofosforovými insekticidy (OFI) představují celosvětový zdravotnický problém – dle Světové zdravotnické organizace (WHO) se jimi ročně intoxikováno kolem 2 000 000 lidí a z nich přibližně 200 000 na následky otravy zemře (Karralliedde 1999). Profesionální a náhodné otravy jsou v rámci celosvětového měřítko nejčastější v rozvojových zemích jako důsledek selhání bezpečnosti práce v zemědělství. Tyto otravy tvoří až jednu polovinu všech zaznamenaných intoxikací. OFI bývají též často zneužívány v sebevražedném úmyslu (Eddleston 2000).

**Tabulka 3:** Přehled organofosfátů užívaných ve veterinární medicíně a insekticidů:

	
<b>Dichlorvos</b>	<b>Malathion</b>
	
<b>Parathion</b>	<b>Profenofos</b>
	
<b>Dimefox</b>	<b>Fenitrothion</b>

Dále pak jsou tyto látky používány k lékařským účelům jako ophtalmologika a také k vědeckým účelům, kdy jsou studovány jako jedna z možností využití v terapii a prevenci demence Alzheimerova typu a také pro studium nervových funkcí.

**Tabulka 4:** Struktury užívaných organofosfátů v oftalmologii:

	
<b>DFP</b>	<b>Paraoxon</b>

## **2.2 Charakteristika NPL užitých v pokusu:**

### **Tabun:**

Jeho akutní toxicita je velmi vysoká a závisí na bráně vstupu do organismu. Nejzávažnější branou vstupu vzhledem k vysoké těkavosti látky jsou dýchací cesty. Odhadovaná střední letální koncentrace v ovzduší vedoucí po 1 minutové expozici ke smrti 50 % exponovaných nechráněných osob se pohybuje mezi 0,03 a 0,08 mg.l<sup>-1</sup>. Střední letální dávka při zamoření nechráněné kůže se pohybuje mezi 0,7 až 7,0 mg.kg<sup>-1</sup> hmotnosti exponovaného jedince (Kunešová 2005).

Přestože tabun patří mezi nejstarší NPL, antidotní terapie akutních otrav touto toxikou nebyla dosud uspokojivě vyřešena. Obtížná reaktivovatelnost tabunu vyplývá jednoznačně z jeho struktury, která je odlišná od dalších látek ze série G. Jednou z nejdůležitějších odlišností v jeho chemické struktuře je přítomnost dimethylamidové skupiny (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N- místo methylové CH<sub>3</sub>-. Tato diference je zřejmě příčinou rozdílu v reaktivovatelnosti inhibovaného enzymu s pyridiniovými oximy. Pro reakci látek typu oximu, resp. oximátového aniontu, který je účinnou formou reaktivátoru, je nezbytný elektronový deficit ve vazbě, která má být štěpena. U tabunu je však vznikající elektronová deficiencie eliminována volným elektronovým párem amidického dusíku a atak nukleofilu je tím znemožněn nebo alespoň ztížen (Cabal 1999).

### **Soman:**

Odhadovaná střední letální koncentrace této NPL v 1 m<sup>3</sup> ovzduší vedoucí po 1 minutové expozici ke smrti 50 % exponovaných nechráněných osob je udávána

hodnotou 70 mg. Střední letální dávka při zamoření nechráněné kůže po dobu 1 minuty se pohybuje v okolí hodnoty 10 000 mg na m<sup>2</sup> kůže exponovaného jedince, v průběhu prostupu nedochází k poškození kůže.

Poločas intoxikace je velmi krátký, dochází k rychlému nástupu příznaků, poločas detoxikace v organismu je dlouhý, jelikož dochází ke kumulaci v tukových tkáních.

### **2.3 Farmakokinetická charakteristika:**

Organofosfáty se jako vysoce lipofilní látky velice rychle absorbují, pokud neobsahují v molekule kvarterní dusík (např. echothiofonát). Do organismu savců se dostávají všemi branami vstupu včetně spojivek a neporušené kůže (Vopršalová 1996). Perkutánní absorpci navíc usnadňují různá rozpouštědla, která mohou být například součástí insekticidních přípravků (chlorované uhlovodíky, xylen, toluen). Při expozici organismu je kromě intravenózního (i. v.) podání pozorováno zpoždění, které je dáno průnikem NPL biologickými membránami (Patočka 2004a). Nástup příznaků intoxikace a jejich intenzita závisí na dávce a bráně vstupu organofosfátů do organismu. Při inhalaci se příznaky objevují již po několika minutách, při perorálním (p.o.) podání za 15 minut až 1 hodinu, po kožní absorpci za 2 – 3 hodiny (Vopršalová 1996).

Po vstupu NPL do intoxikovaného organismu zde probíhají další tři fáze účinku NPL: transport, metabolizace a vlastní toxický efekt (Patočka 2004a). Transport NPL je zajišťován krevním oběhem, jímž je látka zanesena na místo metabolického nebo toxického efektu.

Metabolismus organofosfátů je pak výsledkem biochemických reakcí, jejichž následkem z toxikologického hlediska může být detoxikace mateřské látky, ale

v některých případech může dojít k zachování původní toxicity nebo tvorbě metabolitů s vyšším účinkem a i vyšší toxicitou - tento mechanismus je znám u organofosforových insekticidů, např. paraoxon vzniklý z parathionu (Vopršalová 1996). NPL (zejména soman) se mohou deponovat v tukové tkáni, ze které jsou postupně vyplavovány, tím dojde k prodloužení účinků toxické látky na organismus.

Vlastní toxický efekt je pak v centrálním a periferním nervovém systému a na nervosvalové ploténce, kde NPL inhibuje acetylcholinesterázu (AChE), která již nemůže štěpit acetylcholin (ACh) a na cholinergních synapsích se projeví důsledky jeho zvýšené koncentrace (Patočka 2004a).

Vlastní toxický efekt je realizován jen zlomkem podané dávky NPL, zbytek podané dávky představují ztráty, vznikající nejrůznějším způsobem. Ztráty mohou dosáhnout podle druhu NPL až 99 %. V krevním oběhu reaguje NPL s esterázami či dalšími enzymy (butyrylcholinesteráza, BuChE, karboxylesteráza a fosforylfosfatáza v plazmě), vazba NPL na tyto enzymy nevyvolá žádné klinické příznaky, takže tyto působí jako scavengery (vychytávači). Vážou na sebe část dávky, která vstoupila do vnitřního prostředí organismu a vyřazují ji z vlastního toxického účinku. Je to velmi důležitý děj, protože se předpokládá, že pouze 1 – 3 % z celkové dávky se dostane na místo toxického účinku, tedy k cholinergním synapsím periferního a centrálního nervového systému (Patočka 2004a).

## **2.4 Farmakodynamická charakteristika:**

Mechanismus působení NPL v organismu je inhibice životně důležitého tělu vlastního enzymu AChE. AChE v organismu zodpovídá za hydrolýzu klíčového mediátoru nervového systému ACh (Vopršalová 1996). Pro velmi pevnou vazbu na molekulu AChE přetrvává jejich účinek dlouhodobě (dny, týdny) a mohou se objevit i

pozdní, zejména neurotoxické komplikace způsobené inhibicí tzv. neurotoxické esterázy (NTE) (Lincová 2002). Z toho vyplývá, že za akutní projevy intoxikace a pozdní projevy zodpovídá tělu vlastní ACh.

#### **2.4.1 Acetylcholin:**

ACh je neurotransmiterem (NT) parasympatiku. Uvolňuje se na všech pregangliových zakončeních, na postgangliových zakončeních parasympatiku a některých vláken sympatiku - vazodilatační vlákna cév kosterních svalů, neurony potních žláz (Trojan 2003). ACh je syntetizován v cytoplazmě neuronů z acetyl – CoA a cholinu. Limitujícím krokem v tomto procesu je rychlost přívodu cholinu (Martínková 2002).

Vzniklý NT je pak aktivně přenášen do vezikul, ve kterých je skladován. Množství ACh skladovaného v jedné vezikule kolísá od 1 000 do 50 000 molekul a jeden motorické neuron obsahuje 300 000 i více vezikul (Lincová 2002). Uvolnění ACh z vezikul nervového zakončení je iniciováno vzruchem, který po dosažení nervového zakončení otevírá napětím řízené kalciové kanály (N-podtyp, neuronální). Influx kalcia presynapticky aktivuje řadu proteinů (synaptobrevin, synaptotagmin, SNAP atd.) asociovaných s membránou zásobních vezikul a s presynaptickou membránou (Martínková 2002). Tím je umožněno splynutí membrány vezikul se synaptickou membránou a důsledkem je synchronizované vylití obsahu určitého počtu (kvanta) vezikul do synaptické štěrbině. Množství uvolněného NT je úměrné množství kalciových iontů, které vstoupily do cytoplazmy nervového zakončení (Lincová 2002).

Po průchodu ACh synaptickou štěrbinou dochází ke kontaktu s acetylcholinovým receptorem na postsynaptické membráně. Navázáním se změní

konformace receptoru a membrána neuronu se stane propustná pro ionty, které začnou proudit do buňky a z buňky a vzniklý elektrický potenciál se dál šíří po nervovém vlákne jako elektrický impulz k další synapsi (CNS, vegetativní ganglium). Jedná-li se o membránu cílových tkání, dochází přímo k vyvolání parasymptomimetických účinků. Po rozložení acetylcholinu se receptor vrací do původního stavu (Patočka 2004a).

#### **2.4.2 Acetylcholinové receptory:**

Acetylcholinové receptory (AChRs) v CNS savců můžeme rozdělit na muskarinové a nikotinové na základě schopnosti přírodních alkaloidů, muskarinu a nikotinu, které mají na těchto receptorech stejný efekt jako ACh (Palacios 1991). AChRs také zprostředkovávají synaptickou transmissi na nervosvalové ploténce. AChRs, které vykazují rychlou excitační akci ACh, jsou nazývány nikotinové AChRs (nAChR), protože mohou být aktivovány nikotinem (Patočka 2004b). NACHR se nacházejí ve vegetativních gangliích, v kosterních svalech a v mozku (Trojan 2003). AChRs, které zprostředkovávají pomalou akci acetylcholinu se nazývají muskarinové AChR (mAChR), protože mohou být aktivovány muskarinem (Patočka 2004b).

NACHRs zprostředkovávají průchod draselných a sodných iontů skrz synaptickou membránu. Existují dva typy těchto receptorů: neuromuskulární nAChRs, které přenášejí signály mezi nervovou a svalovou buňkou a neuronální nAChRs, které můžeme najít v nervovém systému. NACHRs mají značnou roli v projevu ztráty nocicepce, kognitivním výkonu, modulaci postižení a zvýšením uvolňování dalších neurotransmiterů (Patočka 2004b). Tyto receptory obsahují pět stejných podjednotek, které jsou uspořádány homopentametriky nebo

pseudopentametry, v závislosti na typu přítomných podjednotek (Le Novere 2002).

MACHRs byly poprvé definovány na základě selektivního působení agonisty muskarinu a antagonisty atropinu (Paton 1952). MACHR existuje v několika typech (M1 – M5), tyto typy mají tkáňově specifickou předlohu pro transkripci (Volpicelli 2004). Tyto receptory jsou přítomny v neuronech v centrálním a periferním nervovém systému, v srdečním svalu a hladkých svalech a různých exokrinních žlázách (Hirota 2001).

M2 receptory jsou lokalizovány primárně v srdeční tkáni a jsou také exprimovány v menším množství v hippocampu, mozkové kůře, striatu, thalamu, plicích, vas deferens a děloze (Patočka 2004b). Na periférii, mACHRs zprostředkovávají kontrakce hladkého svalů, žlázovou sekreci, a modulaci srdečního rytmu a kontraktility. V CNS zprostředkovávají motorickou kontrolu, regulaci teploty, regulaci krevního tlaku a ovlivnění paměti (Scarpeto 2003).

Při blokování AChE dochází k hromadění ACh v synaptické štěrbině a jeho nepřetržitému působení na receptorech, které jsou uloženy na postsynaptické membráně. Je tedy patrné, že dochází k celkovému ovlivnění organismu a to jak na úrovni vedení vzruchu, tak i přímým ovlivněním orgánů s parasymptickou inervací na kterých pak převládne působení parasympatiku (parasympatomimetické působení).

### **2.4.3 Acetylcholinesteráza:**

AChE se vyskytuje přímo v synaptické štěrbině a jejím přímém okolí, dále pak na nervosvalové ploténce, v červených krvinkách a v CNS. AChE je vázaná na buněčné struktury, především na membrány. AChE existuje v různých



molekulárních formách, např. asymetrická a globulární forma, nebo může být členěna dle množství podjednotek na monomer, dimer a tetramer (Massoulie 1993). Bylo dokázáno, že tyto jednotlivé formy jsou rozdílně lokalizovány v neuronu. Monomerní AChE (tzv. G1) je uvolňovaná z buněk v přítomnosti solných roztoků, což poukazuje na to, že se nachází v cytosolu, tetramerní AChE (tzv. G4) je uvolňována v roztocích obsahujících detergenty, tato skutečnost vede k závěru, že G4 je forma vázaná na membrány (Rieger 1976).

Za normálních okolností je tento degradační enzym v nadbytku, neboť velmi rychlé ukončení působení ACh je pro organismus životně důležité. Cholinergní impulzy mohou vést k uvolnění až 1 000 „kvant“ ACh za sekundu a při nedostatečném rozkladu hrozí kumulace ACh a cholinergní krize (Lincová 2002).

Molekula AChE je tvořena dvěma peptidovými řetězci, ty se označují alfa a beta. Řetězec beta obsahuje beta-anionické místo a gama-anionické místo (oblast hydrofóbních interakcí). Aktivní místo enzymu je na alfa řetězci, skládá se z alfa-anionického místa (tvořeno karboxylem kyseliny asparagové, případně glutamové) a esterického centra v němž důležitou roli hraje aminokyselina serin (Hartl 2001). V jeho blízkosti se nacházejí ještě další aminokyseliny, histidin a glutamová kyselina. Aktivní místo je umístěno v hluboké a úzké prohlubni, na jejímž povrchu se nachází větší množství aromatických zbytků (Dougherty 1990).

Podle nejnovější teorie právě tento elektronově bohatý systém prostřednictvím kation- $\pi$  interakce zajišťuje vazbu kvartérního dusíkového atomu substrátu k aktivnímu místu enzymu. Původní teorie předpokládala vazbu kvarterního dusíkového atomu substrátu k tzv. anionickému místu, tvořeného karboxylovou funkcí glutamové kyseliny (Majewski 1979).

Interakce AChE a ACh se podobá jeho interakci s receptory. K hydrolýze ACh účinkem AChE dochází tak, že se molekula substrátu přimkne k aktivnímu centru

enzymu. Takto navázaný ACh se pak štěpí na cholin a zbytek kyseliny octové (acetyl). Cholin je na enzym vázán jen slabými vazbami a proto je posléze uvolněn. Acetyl se přenesse z ACh na volnou hydroxylovou skupinu, kterou obsahuje serin. Vzniká tak acetylovaná AChE, která je během zlomků sekundy reaktivována hydrolýzou na kyselinu octovou a AChE (Hartl 2001). Tato reakce probíhá velmi rychle, je to dáno řadou konformačních změn v molekule acetylované AChE. Acetylovaný enzym je nestálý a v přítomnosti vody rychle deacetyluje, čímž se obnovuje jeho nukleofilní hydroxymethylová skupina serinu (Dougherty 1990). Jedna molekula enzymu hydrolyzuje řádově  $10^5 - 10^6$  molekul acetylcholinu za minutu.

AChE obsahuje kromě aktivního místa i jiná vazebná místa, tzv. allosterická, kam se mohou vázat i další ligandy. Ty nemusí mít strukturu podobnou nativnímu substrátu a k vyvolání výrazné změny enzymové aktivity stačí i velmi malé koncentrace těchto látek. Přítomnost těchto allosterických míst byla v případě AChE prokázána kinetickými studiemi i pomocí monoklonálních protilátek (Barak 1995).

Druhým degradačním enzymem je tzv. pseudocholinesteráza (cholinesteráza, též butyrylcholinesteráza), která přednostně rozkládá jiné substráty než ACh (Lincová 2002). V lidském těle je syntetizována v mnoha tkáních, zahrnující játra, plíce, srdce a mozek (Patočka 2004b). Po dlouhou dobu byla fyziologická funkce BuChE nejasná. V nynější době již byla role BuChE upřesněna, například v lipoproteinovém metabolismu (Kutty 1994), buněčné adhezi a neurogenezi (Layer 1995), v procesu vychytávání toxických molekul (Schwarz 1995), a v procesu tvorby amyloidových prekurzorových proteinů (Balasubramanian 2001).

#### 2.4.4 Interakce AChE a NPL:

AChE může být inhibována celou řadou látek. Je-li jejich inhibiční účinek založen na nevazebných interakcích, jedná se o reverzibilní proces (např. v případě kvartérních amoniových solí včetně reaktivátorů). Některé typy sloučenin však reagují s hydroxymethylovou skupinou serinu za vzniku kovalentní vazby. Je-li vzniklý komplex stabilní, jedná se v podstatě o ireverzibilní inhibici.

Nejdůležitějším místem aktivního povrchu AChE je tzv. katalytické centrum, které je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu, tzv.  $\alpha$ -anionické místo (Bajgar 1991). Účinek organofosfátů spočívá v kovalentní vazbě fosforu na OH-skupinu molekuly serinu v esterickém centru AChE. Tato fosforylace centra odpovídá acetylaci, což je mezireakce při hydrolýze ACh. Defosforylace na rozdíl od deacetylace probíhá tak pomalu, že simuluje ireverzibilní poškození enzymu: aktivní centrum totiž už není k dispozici pro hydrolýzu ACh. ACh není „schopen“ vytěsnit zbytek kyseliny fosforečné od enzymu, organofosfáty jsou tedy ve vztahu k ACh nekompetitivní inhibitory (Lüllman 2004).

Vazba organofosfátu na AChE probíhá ve dvou fázích. V první fázi je vazba je reverzibilní a tuto můžeme ovlivnit reaktivátorem. Rychlost přechodu na druhou, nevratnou formu (toto nazýváme „stárnutí“, anglicky „aging“) je u jednotlivých organofosfátů různě rychlý. U některých jsou to sekundy (soman), u jiných i hodiny (VX) (Prokeš 2005). Po chemické stránce se jedná se o dealkylaci – odštěpení alkylové skupiny z komplexu inhibitor-esteráza. Rychlost stárnutí tedy závisí na alkylové skupině, která je navázaná na fosfor (Patočka 2004b). Stárnutí je v některých publikacích také popisováno jako rozštěpení jedné z vazeb kyslíku na fosfor, čímž dojde k zesílení vazby fosforu na enzym.

Proto je tendence využívat jako insekticidy takové inhibitory cholinesterázy, které jen pomalu a z malého procenta stárnou, naproti tomu jako bojové látky vyvíjet takové sloučeniny, které stárnou obzvlášť rychle, takže po vzniku otravy není možné enzym reaktivovat (Lüllman 2004).

Fosforylovaná AChE může podlehnout spontánní hydrolyze (Vandekar 1957, Davison 1955). Spontánní znovuoobnovení aktivity (reaktivace) inhibovaného enzymu probíhá velmi pomalu, stejně jako syntéza AChE de novo (Patočka 2004a). Trvá přibližně 50 dní, než se AChE v mozku plně regeneruje. V bezjaderných erytrocytech, které nejsou schopny syntetizovat bílkoviny, se zotaví jejich enzymová aktivita až po nahrazení otrávených buněk novými erytrocyty. Nebezpečné příznaky otravy vymizí však již v okamžiku, kdy se obnoví pouhý zlomek normální enzymové aktivity (Lüllman 2004). Spontánní regenerace je chemická reakce a je tedy závislá na množství enzymu, teplotě a pH organismu (Patočka 2004b).

## **2.5 Problematika intoxikace NPL:**

### **2.5.1 Klinický obraz akutní intoxikace:**

Podstatou klinického obrazu otravy organofosfáty je nahromadění ACh na místech jeho fyziologického účinku. Podle toho, na kterých receptorech nastává nahromadění ACh a tedy nadměrný přenos vzruchů na periferii, rozdělují se klinické příznaky otravy na muskarinové, nikotinové a centrální (Vopršalová 1996). V závislosti na stupni intoxikace mohou být tyto příznaky vyjádřeny v různé míře. Příznaky muskarinového typu jsou dané akumulací ACh na synapsích vegetativního systému, příznaky nikotinové pak hromaděním ACh na neuromuskulárních ploténkách motorických nervů a v gangliích. Centrální příznaky jsou vyvolány

nerovnováhou mezi cholinergním přenosem nervového vzruchu a ostatními neuromediatorovými systémy v CNS (Bajgar 1991).

Nejčasnějším projevem intoxikace je zúžení zornic (mióza) doprovázená poruchou akomodace způsobenou znehybněním ciliárního svalu, tedy obecně zhoršeným viděním. Dalšími příznaky muskarinového typu jsou pak překrvení a otok nosní sliznice, zvýšená činnost slinných, slzných a potních žláz. Závažné jsou příznaky v bronších a to je obstrukce dýchacích cest (zvýšenou sekrecí bronchiálních žlázek a zúžením bronchů), tím se prodlužuje výdech, což může vést až k dušnosti, bolesti na hrudi či k cyanóze, dále pak na hladké svalovině trávicího traktu (nechutenství, nausea, zvracení, křeče, průjem, tenesmy a nucená defekace) a močového měchýře, kdy se zvyšuje frekvence močení (Kassa 1993). Na srdci je v důsledku zvýšeného tonu parasymptiku pozorována bradykardie a také pokles krevního tlaku (Patočka 2004a).

Nikotinové příznaky jsou charakterizovány svalovou ochablostí, třesem, záškuby jednotlivých příčně pruhovaných svalů, které se postupně rozšiřují na všechny kosterní svaly těla. Svalové fascikulace brzy přecházejí v intenzivní křeče, které mohou vyústit až v ochrnutí (paralýzu) kosterního svalstva (Patočka 2004a). Účinky na sympatických gangliích se na organismu projevují bledostí a tachykardií, což vede k přechodnému zvýšení krevního tlaku (Vopršalová 1996, Kassa 1993).

Centrální příznaky jsou charakterizovány depresiemi dechových a kardiovaskulárních center v oblasti prodloužené míchy, bolestmi hlavy, úzkostí, nadměrnou emoční labilitou, napětím, neklidem, závratěmi, depresivními stavy, zmateností, poruchami hybnosti a nezřídka i bezvědomím (Patočka 2004a).

Při intoxikaci nižšími dávkami, které nejsou často ani klinicky diagnostikovány a nejsou patrné žádné typické klinické příznaky, jako je mióza či fascikulace, dochází k narušení kognitivních funkcí, kde nejdůležitějším korelačním faktorem je snížení

aktivity AChE v hippocampu (Brito, 1983). Pokles kognitivních funkcí se vyznačuje poruchami úsudku a myšlení při cílených činnostech a při všeobecném zpracování informací. Zároveň bývá patrná emoční labilita, podrážděnost či apatie a změny sociálního chování. U postiženého jedince přitom není porušeno vědomí a nejsou známky deliria (Nevšimalová 2002).

Nejpodstatnější patogenetický faktor intoxikace představuje hypoxie a hyperkapnie v důsledku respirační insuficience, vyvolané blokadou cholinergního přenosu dráhy dýchacího reflexu. Zvýšená hladina ACh a porušená permeabilita membrán vede k narušení hladin iontů (sodík, draslík, vápník), což má za následek celkový rozvrat metabolismu a prohloubení nespecifikované stresové reakce organismu - zvýšení hladiny kortikosteroidů, cyklických nukleotidů aj. (Bajgar 1991).

Smrt v případě těžkých akutních otrav nastává následkem bronchospasmu nebo paralýzy příčně pruhovaného svalstva, především bránice, popřípadě u látek s výraznými centrálními účinky následkem centrálního útlumu dechu (Vopršalová 1996). Těžká dechová nedostatečnost postupně vede k zástavě dechu s následnou zástavou srdce (Patočka 2004a). Vědomí bývá obvykle dlouho zachované (Vopršalová 1996).

V průběhu otravy může být také pozorována tzv. „opožděná fáze akutní otravy“, je charakterizována jako období po překonání akutní respirační insuficience a z biochemického hlediska rozvojem nespecifických příznaků, které souvisejí s porušenou permeabilitou buněčných membrán, nízkou saturací tkání kyslíkem a značným energetickým výdejem (Bajgar 1991). Je charakterizována patologickými poruchami srdečního rytmu a respirace. Závažnou komplikací této fáze je i sekundární infekce, která se může vyvinout již druhý den po intoxikaci.

### **2.5.2 Pozdní neurotoxický efekt:**

Pozdní neurotoxický efekt se projevuje poruchou funkce periferního i centrálního neuronu a jeho denenerativními změnami (degenerace axonů a následná degenerace myelinu), pravděpodobně jako důsledek změn aktivity NTE (Patočka 2004a). To znamená, že neurotoxicita není podmíněna inhibicí AChE, některé organofosfáty fosforylují jiný enzym přítomný v nervové tkáni, NTE, která zodpovídá za rozvoj opožděné neurotoxicity. Specifická terapie pro tuto formu neurotoxicity není známa (Vopršalová 1996). Přitom neurotoxicita se rozvíjí už při minimálních expozicích, které nezpůsobily ještě žádnou měřitelnou inhibici AChE, otrava organofosfáty tedy nemusí být klinicky diagnostikována.

Pozdní neurotoxický efekt se často manifestuje až za více dnů až týdnů po expozici, je charakterizována senzoryckými poruchami: mravenčením a bolestmi, které se z počátku objevují distálně v končetinách, pak stoupají a zesilují. Současně se vyvíjejí motorické poruchy, které se z počátku objevují také distálně a končí v mnoha případech parálýzou končetin (Lüllman 2004). Jde o parálýzu s minimálním postižením senzitivní inervace. Poté následuje stadium denervace a po ní se vyvíjí těžká atrofie svalů horních i dolních končetin (Patočka 2004a). Klinický obraz lze tedy označit jako polyneuropatii.

Specifická medikamentózní léčba není dosud známá. Může následovat částečná reparace, avšak období rekonvalescence bývá velmi dlouhé (Patočka 2004a). Ústup příznaků trvá měsíce i roky (Lüllman 2004). I po několika desítkách let se zjišťuje sklon k spasticitě a abnormální šlachové reflexy (Bajgar 1991).

## **2.6 Problematika terapie otrav NPL:**

### **2.6.1 Nespecifická terapie otrav NPL:**

Vzhledem k vysoké toxicitě organofosfátů a rychlému nástupu účinku, musí být terapie dostatečně rychlá, radikální a komplexní (Vopršalová 1996). Pro každou závažnější intoxikaci NPL je charakteristický po několikaminutové latenci dramatický průběh provázený vážným narušením základních životních funkcí končící bez adekvátní terapie smrtí během 20 – 30 minut. Vzhledem k bezprostřednímu ohrožení života v případě závažnějších intoxikací musí být terapie zahájena co nejdříve. Proto má zásadní význam úspěšná první pomoc, která může při včasné a správném poskytnutí zachránit život otráveného a zásadně ovlivnit i další průběh otravy, včetně její prognózy (Prymula 2002).

V rámci první pomoci je třeba zabránit další absorpci inhibitoru AChE. Při průniku kůží by měl být co nejdříve odstraněn kontaminovaný oděv a exponovaná pokožka důkladně omyta mýdlem a vodou. Při vniknutí jedu do oka je třeba vypláchnout spojivkový vak a vkápnout 1 % roztok atropinu. V případě perorálních otrav se provádí velmi účinná laváž žaludku vodou a aktivním uhlím, které nespecificky váže přítomný organofosfát. Velmi dobře se osvědčila i eliminace toxické látky z krve hemoperfuzí (Vopršalová 1996).

V rámci AČR, by první pomoc při otravě NPL měla navíc zahrnovat podání antidot, což jsou látky specificky zabraňující toxickému účinku NPL pomocí autoinjektoru, zamezení dalšího průniku jedu do organismu a to nasazením prostředků individuální ochrany (ochranná maska) a odmořením zasažených míst pomocí individuálního protichemického balíčku, obsahujícího k tomuto účelu Desprach. Včasné odmoření může zabránit vzniku otravy, nebo podstatně zmírnit její rozvoj.



### **2.6.2 Funkční antidota v terapii otravy NPL:**

Anticholinergika (funkční antidota) zabraňují nadměrné stimulaci AChRs tím, že brání navázání nahromaděného ACh na tyto receptory (Prymula 2002). Z anticholinergik je běžně podáván jen atropin, který antagonizuje periferní muskarinové příznaky, poměrně málo centrální (neboť obtížně prochází přes hematoencefalickou bariéru) a prakticky neovlivňuje nikotinové (Bajgar 1991). Toto antidotum se podává s cílem antagonizovat salivaci, bronchiální sekreci a bronchokonstrikci, zatímco kosterní svalstvo (včetně svalů respiračních) zůstávají neovlivněny a tedy paralyzovány (Vopršalová 1996). Podává se i.v. nebo intramuskulárně (i.m.) v úvodní dávce 2 – 5 mg (u dětí 0,5 – 2,0 mg podle věku) a podle tíže otravy se jeho podání opakuje v 10 – 30 minutových intervalech až do mírné atropinizace pacienta (rozšíření zornic – mydriáza, suchost sliznic, tachykardie, zčervenání kůže) (Bajgar 1991).

Pokud je to možné, je výhodné podávat atropin v infuzi. Tolerance organismu intoxikovaného NPL je vůči atropinu tak vysoká, že prakticky není možné intoxikovaného jedince atropinem předávkovat (Patočka 2004). V extrémních případech je možno podat až 4 000 mg v infuzi za den (Lüllman 2004). U léčby atropinem je nebezpečí vzniku fibrilace komor při velké hypoxii. Proto je nutné při podání vysokých dávek atropinu zabezpečit i oxygenoterapii (Bajgar 1991).

U těžkých intoxikací je možné doplnit atropinizaci podáváním jiných anticholinergik které mají silnější centrální účinky, a to zvláště u intoxikací NPL s převahou centrálních účinků (soman, sarin). V AČR je zaveden jako druhé anticholinergikum vedle atropinu benaktyzin (Prymula 2002). Benaktyzin se podává p.o. a to v dávce (3 – 5 mg denně), navíc také příznivě ovlivňuje křečovou složku otravy. Z dalších anticholinergik byla experimentálně zkoušena řada látek, mnoho

z nich nedosáhlo širšího uplatnění a jen některá byla klinicky zkoušena (Bajgar 1991). Jako další vhodná anticholinergika s převahou centrálního účinku se jeví biperiden a skopolamin (Patočka 2004a).

### **2.6.3 Kauzální antidota v terapii otravy NPL:**

Reaktivátory AChE (kauzální antidota) jsou sloučeniny, kterým se daří znovu reaktivovat již intoxikovanou AChE, a v omezené míře také nescifickou sérovou cholinesterázu (Lüllman 2004). Myšlenka, že jisté sloučeniny mohou značně urychlit spontánní regeneraci fosforylované AChE je spojována s Wilsnovým experimentem s hydroxylaminem a cholinem (Wilson 1951).

Hydroxylamin potvrdil hypotézu, že je nezbytné najít sloučeniny se zlepšenými nukleofilními vlastnostmi, zatímco cholin potvrdil teorii, že kvarterní dusík může zesílit nukleofilní atak (Wilson 1955). K tomuto účelu jsou tedy vhodné sloučeniny, které mají nukleofilitu vyšší než voda, např. hydroxylamin, hydroxamové kyseliny a oximy (Hartl 2001). Terapeutický potenciál takovýchto látek stimuloval výzkum, který vyvrcholil objevením pralidoximu Wilsonem a Ginsburgem (Wilson 1955) a také Childsem a kolektivem (Childs 1955). V dnešní době je známo několik set takovýchto sloučenin, které byly pojmenovány jako reaktivátory fosforylované AChE (Kassa 2002).

U reaktivátorů cholinesteráz je požadavek přiměřené rychlosti reakce s enzym-inhibitorovým komplexem také jedním z prioritních parametrů, dostatečnost takové rychlosti reakce je však podmíněna efektivní vazbou reaktivátoru na enzym a transportem reaktivátoru k cílovému orgánu doprovázeném jen minimálními ztrátami.

Obecně platí, že reaktivační účinnosti oximů jsou poměrně omezeny, přičemž hlavní příčinou je rychlost stárnutí inhibovaného enzymu, proto musí být podány dostatečně brzy, nejlépe v prvních minutách po intoxikaci. Jakmile komplex enzym-organofosfát zestárne, nejsou oximy schopny enzym reaktivovat.

Mechanismus působení oximů je založen na znalosti, že organofosfát má vyšší afinitu k oximům než k AChE. Oximová skupina je vysoce nukleofilní, reaguje s fosfátem inaktivovaného enzymu, vzniká komplex oxim-organofosfát a AChE se uvolňuje. Účinek oximů nastupuje velmi rychle, aktivita motorických nervů se obnovuje po i.v. podání za několik minut. Méně výrazně než na nervosvalovém spojení se účinek oximů projevuje na efektorových místech parasymptiku, a v CNS je jejich účinek pouze nevýznamný (Lincová 2002).

Oximy jsou syntetické látky, které obsahují vysoce nukleofilní skupinu  $R-CH=N-OH$ . Nejvýznamnější představitelé jsou trimedoxim a pralidoxim, tyto látky však ve své molekule obsahují kvarterní dusík, což je příčinou velmi nízkého přestupu přes hematoencefalickou bariéru (Lincová 2002).

Pralidoxim je zástupcem monokvarterních oximů, výhodnější vlastnosti má trimedoxim, který je řazen do skupiny biskvarterních oximů, které vzhledem ke své struktuře mohou reagovat se dvěma anionickými centry enzymu a jsou také lipofilnější, takže lépe procházejí hematoencefalickou bariérou (Hartl 2001). Stejně tak je ve světě znám a používán obidoxim, vyráběný pod názvem Toxogonin®. Zlepšení průchodu přes hematoencefalickou bariéru je jeden z nejdůležitějších důvodů k syntéze a zkoušení nových typů oximů. Tyto látky mají pak také vyšší účinnost v reaktivaci AChE na nervosvalové ploténce (Vopršalová 1996).

Také poměrně nízká reaktivační účinnost výše uvedených reaktivátorů AChE vedla k pátrání po nových, účinnějších oximech, z nichž oxim označovaný jako HI – 6 se dočkal na základě experimentálních výsledků také klinických zkoušek a zavedení

do léčebné praxe (Patočka 2004a). Další ze známých látek je diacetylmonoxim, který prochází přes hematoencefalickou bariéru a zřejmě také regeneruje cholinesterázu v CNS (Vopršalová 1996).

#### **2.6.4 Další možnosti doplnění terapie:**

Další terapie pak zahrnuje přerušování centrálně vyvolaných křečí tlumícími látkami, například diazepamem nebo avisatonem, které jsou zároveň lékem první volby. Zvláště při použití periferně působícího anticholinergika atropinu je doplnění antidotní terapie o antikonvulzivum považováno za velmi důležité. Současně se uvažuje také o použití alprazolamu nebo klonazepamu (Prymula 2002). Také je důležité potlačení acidózy podáváním pufovacího roztoku  $\text{NaHCO}_3$  (Lüllman 2004). Občas je nutností léčit symptomatickou silnou bronchiální sekreci, farmakologicky podpořit dýchání (Syntophyllin) a nebo také zavést řízené dýchání nebo oxygenoterapii.

Preventivně lze někdy podávat léčiva ze skupiny karbamátů. Nejdéle známým a nejčastěji užívaným inhibitorem AChE karbamátového typu je přírodní alkaloid Physostigmin. Mechanismus účinku je dán schopností vázat se na AChE, kdy vzniklý komplex se po určité době štěpí a AChE tak regeneruje.

Jako zatím nejlepší preventivní prostředek se ukazuje preparát PANPAL vyvinutý ve VLA JEP Hradec Králové (Prokeš 2005), jehož další nezanedbatelnou výhodou je využití v případě nehod a katastrof. Toto antidotum je tvořeno dvěma tabletami, kdy tableta A obsahuje jako účinné látky benactizini hydrochloridum a trihexylphenidoli hydrochloridum. Účinná složka tablety B je pyridostigmini bromidum. Tento komplexně působící preparát má účinek zachován nejméně po

dobu 8 hodin (Brabec 2000). V současnosti je vyvinuta i náplast pro perkutánní aplikaci, Transant (Prokeš 2005).

### **3 MATERIÁL A METODY:**

#### **3.1 Zvířata:**

Jako pokusná zvířata v našem experimentu byli použiti albinotičtí samci potkanů kmene Wistar, zvířata byla zakoupena z chovu v Konárovicích (Česká Republika). Jejich hmotnost byla v rozpětí 200 – 220 gramů.

Zvířata byla držena ve standardních podmínkách, tj. při  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  a  $50 \pm 10\%$  relativní vlhkosti, ve dvanáctihodinovém intervalu světlo – tma. Pokusná zvířata byla krmena standardní Larsenovou dietou a voda byla podávána ad libidum. Zvířata byla rozdělena ve všech třech následných pokusech do skupin po osmi což je nejnižší počet, který při zkouškách tohoto typu, je-li podána látka v množství 80% LD<sub>50</sub> umožní provést statisticky hodnotitelný pokus.

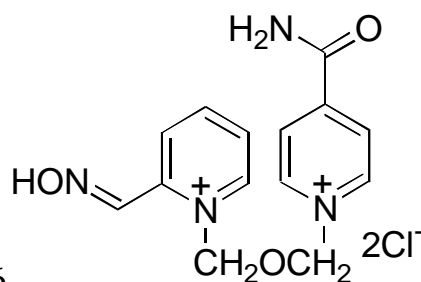
Experiment byl schválen Odbornou komisí Vojenské lékařské akademie a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové v souladu s vyhláškou 207/2004 Sb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Personál manipulující se zvířaty byl předem proškolen a obdržel osvědčení o způsobilosti pracovat s laboratorními zvířaty podle § 17 odstavce 1 zákona.

#### **3.2 Chemikálie:**

Tabun (viz. Tab. č. 1) o čistotě 89 % byl získán z Vojenského Technického institutu v Brně (Česká Republika). Tato čistota byla kvantitativně zjištěna pomocí acidometrické titrace.

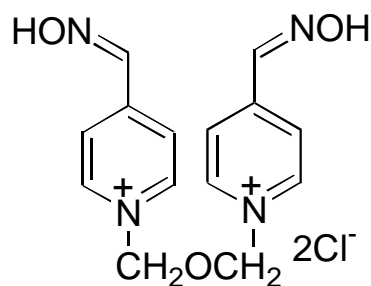
Soman (viz. Tab. č. 1) o čistotě 77 % byl také získán z Vojenského Technického institutu v Brně, a jeho čistota byla zjištěna využitím acidometrické titrace.

Zkratkou HI-6 (Obr. č. 2) se označuje 1-[[[4-(aminokarbonyl)pyridinio]methoxy]methyl]- 2-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium-dichlorid. Jedná se obecně o nejlepší antidotum proti NPL v humánní medicíně, jeho účinnost je nedostatečná pouze u tabunu. V tomto pokuse je použit jako standard při testování nových potenciálních reaktivátorů.



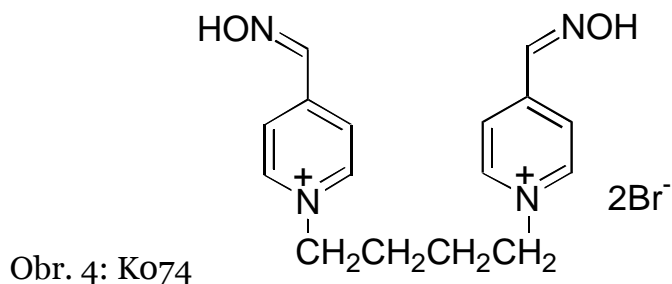
Obr. 2: HI - 6

Obidoxim (Obr. č. 3) je generický název pro 1,1'-oxydimethylen-bis[4-(hydroxy-iminomethyl)pyridinium]-dichlorid. Je použit také jako standard, protože jeho terapeutický účinek vůči intoxikaci tabunem je ze všech známých oximů nejlepší.

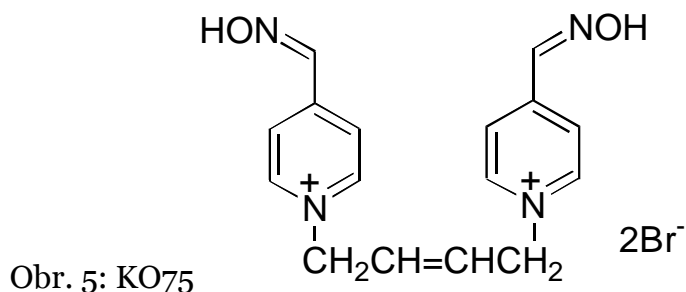


Obr. 3: Obidoxim

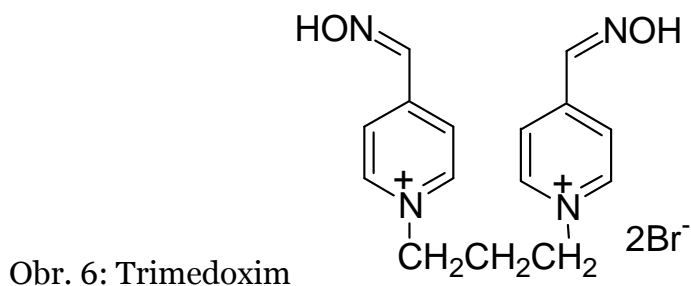
Ko74 (Obr. č. 4) je generický název pro 1,4-bis(4-hydroxyimino-methylpyridinium)butan dibromid. Tento oxim je nově syntetizovaná látka na základě optimalizace účinku chemických struktur vůči intoxikaci tabunem.



Ko75 (Obr. č. 5) je generický název pro sloučeninu (E)-1,4-bis(4-hydroxyimino-methylpyridinium)but-2-en dibromid. Jedná se též o nově připravenou látku.



Trimedoxim (Obr. č. 6) je zavedený název pro sloučeninu 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)propan dibromid. Jedná se o dříve syntetizovanou látku.



Oximy byly syntetizovány na katedře toxikologie, Fakulty Vojenského zdravotnictví v Hradci Králové a jejich čistota byla 98 %. Čistota byla analyzována za užití HPLC.



### **3.3 Metodika:**

#### **3.3.1 Funkční pozorovací baterie:**

NPL působí na organismus neurotoxicky, může způsobit reverzibilní či ireverzibilní poškození centrálního nebo periferního nervového systému. Projevy narušené funkce nervového systému se dají zaznamenat na několika úrovních – od buňky až po organismus jako celek. Nejvýznamnějším ukazatelem neurotoxicity je behaviorální dysfunkce organismu (Abou-Donia 1992).

Existuje mnoho metod kterými lze neurotoxicitu hodnotit. Funkční pozorovací baterie je zpravidla série neinvazivních hodnocení a interaktivních posuzování neurobehaviorální a funkční integrity živočichů (Moser 1988, Tilson 1992). Testování pomocí Funkční pozorovací baterie by mělo představovat postupný přechod od nejméně interaktivních měření po více interaktivní. Měření by mělo být zakončeno neinvazivnějšími postupy, mezi něž je řazena citlovost vůči bolesti (reakce na bolestivý podnět) a rektálním měřením teploty (Jacobson-Kram 2001).

Funkční pozorovací baterie zahrnuje celou škálu metod umožňující testovat motorické, senzitivní a autonomní nervové funkce (Frantík 1995). Metody jsou děleny do čtyř skupin, z nichž většina je hodnocena podle standardně používaných škál. Absolutní hodnoty parametrů Funkční pozorovací baterie jsou zaznamenávány v přehledné souhrnné tabulce (Tabulka 5).

#### **Pozorování v kleci:**

Tímto pozorováním je zahájeno vlastní testování zvířete, jedná se o absolutně neinvazivní postup, kdy není zvíře pod přímým vlivem přítomnosti pozorovatele. Zde se zaměřujeme na polohu a chování zvířete v kleci kdy pouze první tři hodnoty (1, 2, 3) jsou hodnoceny jako normální. Ačkoli se v literatuře běžně uvádí, že hodnocení

piloerkece probíhá během handlingu (Jacobson-Kram 2001), na základě našich zkušeností jsme prováděli pozorování piloerkece již při neinvazivním pozorování zvířete v kleci, jelikož při handlingu dochází k ovlivnění vzhledu srsti rukou hodnotící osoby i reakcí samotného zvířete na handling (Kunešová 2005).

### **Posuzování při manipulaci:**

Po dokončení první části pozorování je zvíře vyjmuto z klece, pozornost je zaměřena na reakce zvířete na snadnost vyjímání stejně jako manipulační zacházení (handling). Zvíře se vždy bere za trup, nikoli za ocas. Následuje orientační klinické vyšetření, zahrnující vyhodnocení svalového tonu, stavu lakrimace, stupně otevření očí, polohy očního bulbu v orbitě, vzhledu spojivky, salivace, přítomnosti nosního sekretu a teploty, barvy a vzhledu kůže.

### **Pozorování ve volném poli:**

Zvíře se umístí do středu podložky, která je položena na rovném ohraničeném prostoru a pozoruje se po dobu tří minut. Hodnotí se přítomnost hyperkinézy, tremoru, tonických a klonických křečí, také chůze a celková pohyblivost zvířete. Pokud se zvíře během tří minut nepohne, jemně jej postrčíme, pokud ani pak nejeví známky aktivity, charakterizujeme chůzi jako shrbenou nebo vláčení těla podle stavu končetin. Dále se hodnotí také další parametry jako dýchání, tenze, projevy vokalizace, přítomnost poruchy hybnosti (ataxie) a obrny (parézy), stereotypie (přirozené chování v masivním výskytu jako je kroužení, čichání a kývání se) a bizardního chování, což je charakterizováno jako jakékoliv chování, které obvykle nepozorujeme a jeví se nám jako nepřirozené.

Nakonec se u zvířete hodnotí úroveň spontánní aktivity, vztyčování čili vertikální explorace (zaznamenává se počet vzpřímů za tři minuty, vzpřímím se

rozumí úplné zdvihnutí předních končetin a to s podporou nebo bez podpory), míra urinace (zaznamenává se počet loužiček za tři minuty, nelze-li je spočítat zapíše se hodnota 10) a defekace (zaznamenává se počet bobků za tři minuty).

### **Hodnocení reakcí na podněty:**

V této fázi hodnotíme reakce pokusného zvířete na vnější podněty. Reakce na přiblížení je prováděno pomocí tupého předmětu, který přiblížíme asi tři centimetry od čenichu v horizontální rovině a držíme jej pět sekund před zvířetem. Reakci na dotyk hodnotíme na základě jemného dotyku tupým předmětem na boku po dobu jedné sekundy. Reakci na akustický podnět zjišťujeme neočekávaným klapnutím předmětem asi pět centimetrů nad zátylkem.

Hodnocení reakce na bolestivý podnět se doporučuje provádět až nakonec pozorování, jelikož se jedná o invazivní měření, které by mohlo ovlivnit další pozorované hodnoty. Kovovou pinzetou se krátce zmáčkne ocas zvířete 2 – 3 centimetry od konce. Také hodnotíme velikost zornic za standardních světelných podmínek a jejich reakce na náhlý paprsek světla.

Součástí Funkční pozorovací baterie je také air righting reflex test, který hodnotí dopad pokusného zvířete ze zádové polohy (zvíře otočené zády k podkladu se pustí z výšky třiceti centimetrů, hodnotí se poloha při dopadu, kdy jako normální hodnota je chápán dopad na všechny čtyři končetiny). Při velmi silném postižení pohyblivosti zvířete se test dopadu neprovádí a hodnotí se pouze schopnost zvířete otočit se zpět do základní polohy poté, co je jemně položeno na záda (Kunešová 2005). Hodnocen je také dopad z vertikální polohy (zvíře se pouští ze stejné výšky, ale je ve svislé poloze – hlava nahoře a pánevní končetiny dole). Následuje hodnocení vzdálenosti stop při dopadu (rozteč při dopadu), výstupek nad čtvrtým prstem zadního chodidla se natře netoxickou barvou, zvíře se drží za hřbet a kořen

ocasů končetinami dolů a pustí se z výšky třiceti centimetrů. Změříme vzdálenosti mezi středy stop, toto opakujeme dvakrát a za výslednou hodnotu je brán průměr z těchto dvou měření.

### **Další hodnocené parametry:**

Po skončení hodnocení reakcí na podnět se u pokusného zvířete měří síla úchopu hrudních a pánevních končetin. K tomuto měření používáme siloměr, ten je napojen na mřížku, která usnadňuje uchopení zvířetem. Zvíře ležící na předloktí vyšetřovatelovy ruky se přenými končetinami zachytne mřížky a rychle odtáhne. Při měření síly zadních končetin se zvíře drží za trup, tak aby se prsty zadních končetin zachytily mřížky a rychle se zatáhne. Naměřená hodnota je přepočtena na jednotku hmotnosti. Tyto měření provádíme vždy dvakrát a z naměřených hodnot vždy vybíráme pro další statistické hodnocení tu vyšší. Nakonec se měří síla všech čtyř končetin najednou. Mezi další hodnocené parametry v této části patří vážení zvířete (zjišťování hmotnosti) s přesností na jeden gram a tělesná teplota v rektu (konec teploměru se potře vazelínou nebo olejem, zasune se do konečníku a vyčká se na ustálení teploty).

Úplně závěrečným hodnocením je spontánní vertikální a horizontální aktivita. Zvíře se umístí do boxu Animexu (konstruován v dílnách Vojenské lékařské akademie JEP v Hradci Králové), kde je po dobu deseti minut zaznamenávána jeho motorická aktivita pomocí infračervených čidel. Součtem vertikálních a horizontálních pohybů zvířete zjistíme jeho celkovou motorickou aktivitu, kterou také statisticky hodnotíme.

**Tabulka 5: Funční pozorovací baterie:**

Parametr	Pouze veličiny diskrétní									
	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7
<b>Poloha v kleci</b>				sedí/stojí	explorální aktivita	spí/leží	atonie	boční poloha	přikrčený	pokles hlavy
<b>Obtížnost manipulace</b>				pasivní	normální	zvýšená reakce	pohyb	útěk	agrese	
<b>Svalový tonus</b>	atonie	hypotonie	normální	hypertonie	rigidita	fascikulace				
<b>Slzení</b>			normální	mírné	silné	krusty	krusty zbarvené			
<b>Postavení víček</b>				otevřená	mírně přivřená	zpola přivřená	zavřená	ptóza		
<b>Endo / exoftalmus</b>		endo	normální	exo						
<b>Srst</b>			normální	zbarvená	rozcuchaná	zbarvená, rozcuchaná	lysina	poranění	jiné změny	piloerectio
<b>Kůže</b>			normální	bledá	zarudlá	cyanotická	pigmentace	studená	poraněná	
<b>Salivace</b>			normální	mírná	silná					
<b>Nosní sekret</b>			normální	mírný	silný	zbarvený				
<b>Klonické jevy</b>			žádné	záškuby	nerytmičkový pohyb	slabý třes	silný třes	myoklonie	křeč	otřepávání
<b>Tonické jevy</b>			žádné	externí rigidita	opistotonus	emprostotonus	prudké skoky	křeč		
<b>Chůze</b>			normální	ataxie	postižení pánevních končetin	prostrace	postižení hrudních končetin	chůze po špičkách	shrbená chůze	vláčí tělo
<b>Skóre postižení chůze</b>				žádné	mírně abnormální	zřetelně abnormální	značně abnormální			
<b>Skóre pohyblivosti</b>				normální	mírně snížená	zřetelně snížená	zcela nepohyblivá			
<b>Aktivita</b>				velmi nízká	občasná	snížená	normální	zvýšená	trvalá	
<b>Tenze</b>			žádná	místní (uši)	stupor					
<b>Stereotypie</b>			žádná	hlava	trup	čištění	běh	jiné		
<b>Bizardní chování</b>			žádné	hlava	trup	automutilace	abnormální pohyb	jiné		
<b>Reakce na přiblížení</b>				žádná	normální	zvýšená	energická	prudká		
<b>Reakce na dotyk</b>				žádná	normální	zvýšená	energická	prudká		
<b>Reakce na zvuk</b>				žádná	normální	zvýšená	energická	prudká		
<b>Reakce na bolest</b>				žádná	normální	zvýšená	energická	prudká		
<b>Velikost zornic</b>	mióza značná	mióza mírná	normální	mydriáza mírná	mydriáza značná					
<b>Reakce na světlo</b>			žádná	normální						
<b>Dopad</b>				normální	ataktický	bok	záda	vzpřím ze ZP	stimul v ZP +	stimul v ZP -

### **3.3.2 Vlastní provedení pokusu:**

Většina parametrů je hodnocena subjektivně osobou provádějící pokus, proto prováděla všechna testování pouze jedna osoba s dostatečnou praxí. Tato osoba hodnotila parametry naslepo, což znamená, že nebyla obeznámena s dávkováním látek u jednotlivých skupin zvířat.

Účinnost vybraných reaktivátorů AChE byla hodnocena *in vivo*, Funkční pozorovací baterií, a to 24 hodin a 7 dní po intoxikaci tabunem. Zvířata byla intramuskulárně intoxikována střední letální dávkou tabunu ( $180 \mu\text{g.kg}^{-1} = 80 \% \text{LD}_{50}$ ). Přesná hodnota  $\text{LD}_{50}$  tabunu byla před tímto experimentem aktuálně stanovena. Jako terapie intoxikovaných zvířat byly použity reaktivátory AchE oximového typu, které byly i.m. aplikovány 1 minutu po intoxikaci: HI – 6, obidoxim, trimedoxim, KO74 a KO75.

Zvolené dávky reaktivátorů byly navzájem ekvimolární, HI – 6 ( $39 \text{mg.kg}^{-1}$ ), obidoximu ( $10,5 \text{mg.kg}^{-1}$ ), trimedoximu ( $22,4 \text{mg.kg}^{-1}$ ), KO74 ( $2,5 \text{mg.kg}^{-1}$ ) a KO75 ( $3,6 \text{mg.kg}^{-1}$ ). Kombinovány byly s v terapii běžně užívanou anticholinergní látkou atropinem v dávce  $21 \text{mg.kg}^{-1}$ . Hodnoty testovaných parametrů tabunem navozené neurotoxicity u experimentálních zvířat byly porovnávány vzhledem ke kontrolní skupině, kde byl místo tabunu a antidota i.m. aplikován pouze fyziologický roztok.

### **3.3.3 Statistické hodnocení:**

Data získaná hodnocením parametrů Funkční pozorovací baterie zahrnují kategorické, ordinální a kontinuální hodnoty. Statistické analýzy byly provedeny pomocí speciálního počítačového interaktivního programu NTX (Frantík 1995). Z kategorických a ordinárních hodnot byly poté vypracovány kontingenční tabulky, které byly dále hodnoceny Chi-kvadrát testem homogenity, Concorgance-

Disconcordance testem a Kruskal-Wallis testem. Kontinuální data byla zpracována pomocí statistických testů: CI for Delta, Bartlettův test, Williamsův test a Testem pro distribuční funkce. Zjištěné rozdíly hodnot byly posuzovány jako statisticky významné, pokud dosáhly alespoň hodnoty  $p < 0,05$  (Tabulka 6).

**Tabulka 6:** Hodnoty statistické významnosti:

<b>x &lt; 0,05</b>	<b>*</b>
<b>x &lt; 0,01</b>	<b>**</b>
<b>x &lt; 0,005</b>	<b>***</b>

## **4 VÝSLEDKY:**

### **4.1 Experiment 1: Hodnocení efektivity oximů K074 a K075 vůči intoxikaci tabunem:**

Výsledná data získaná hodnocení tabunem navozené neurotoxicity 24 hodin a 7 dní po intoxikaci jsou zanesena do tabulek číslo 7. a 8. Dva neléčení, tabunem intoxikovaní potkani uhynuli během prvních 24 hodin. Všichni potkani kteří byli léčení kompletní antidotní terapií, která obsahovala kombinaci anticholinergní látky a reaktivátoru AChE přežili až do konce pokusu trvajících 7 dní.

#### **Hodnocení experimentu po 24 hodinách:**

Funkční pozorovací baterie obsahovala celkem 47 parametrů pro hodnocení motorických, senzoryckých a autonomních nervových funkcí. Hodnocení parametrů provedené 24 hodin po intoxikaci prokázalo 29 statisticky významných neurotoxických znaků u skupiny zvířat intoxikované tabunem, které nebyla podána terapie (Tab.č. 7). U všech skupin jimž byla podána terapie došlo ke snížení počtu znaků navozené neurotoxicity bez ohledu na složení antidotní terapie, u žádné však nedošlo k naprosté eliminaci nežádoucích symptomů navozené toxicity.

Výsledky prokázaly, že jednotlivé kombinace reaktivátorů AChE s atropinem jsou po intoxikaci navozené tabunem rozdílně účinné. Velmi účinnou látkou se nám jevil oxim K075, jedná se o novou látku, která byla syntetizována na katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví. Jeho účinek byl lepší i ve srovnání s obidoximem, který je považován za nejlepší z dosud známých oximů pro terapii tabunem navozené intoxikace.



Pasivní chování se významně projevilo ve skupině intoxikované tabunem bez následné terapie, pasivita jedinců byla zaznamenána i při manipulaci, kdy byl celkový patologický obraz zvířat zvýrazněn nízkým tonusem kosterního svalstva. Pohyblivost a aktivita byla u této skupiny také snižena, což se mimo jiné projevilo i výrazným snížením explorativního vztyčování se ve volném poli, které bylo hodnoceno po dobu 3 minut. Veškerá reaktivita sledovaných zvířat, a to na dotyk, přiblížení, zvuk i bolest byly také výrazně negativně ovlivněny. Dále bylo zaznamenáno slzení a zvýšená nosní sekrece. Toxický účinek tabunu se projevil i na omezené úchopové síle hrudních a pánevních končetin, na zaznamenané hodnotě rozteče při doskoku a na dopadu. Statisticky významně nižší byly hodnoty také horizontální i vertikální motorické aktivity a rektální teploty.

Ve skupinách, kde byl podán obidoxim nebo KO75, byly prokazatelně méně ovlivněny některé z parametrů vzhledem ke skupině intoxikované tabunem. Mezi tyto parametry patřily zejména netečnost zvířete při vyjímání z klece, pasivita zvířete při manipulaci a nižší svalový tonus, i síla končetin byla snižena. Vertikální a horizontální aktivita byla zaznamenána velmi nízká. Nosní sekrece a slzení nebylo zjištěno. Neovlivněna zůstala také pohyblivost a postižení chůze. Reaktivita zvířat na jednotlivé podněty zůstala naprosto normální. Celkový příjem potravy jednotlivců poklesl, ale jejich tělesná hmotnost nebyla v té době ještě tímto faktorem ovlivněna.

Významné u skupiny, které byla podán oxim KO75, bylo i normalizování počtů vzpřímů které svědčilo o lepší svalové síle a zájmu zvířat o nové prostředí, také aktivita, sice občasná, u této skupiny byla zachována. Velikost zornic byla normální, projevila se však jejich zpomalená reakce na světlo.

Porovnáme-li výsledky skupiny, kde byl terapeuticky podán obidoxim se skupinou, kde byla podán oxim KO75 byly zjištěny jen malé rozdíly v terapeutické účinnosti, byla to přítomnost či nepřítomnost mírného lokálního třesu.

Další nově syntetizovaný oxim Ko74, která byla v našem experimentu testována neměla tak dobrou účinnost v porovnání s obidoximem nebo oximem Ko75. Některé ze sledovaných parametrů byly sice terapií pozitivně ovlivněny, ale mnoho jich zůstalo statisticky významně odlišných vzhledem ke kontrolní skupině.

Jako nejhorší z testovaných kombinací byla vyhodnocena terapie obsahující atropin s oximem HI-6. Mnoho z parametrů odpovídalo výsledkům skupiny intoxikované tabunem bez následného terapeutického zásahu.

### **Hodnocení experimentu po 7 dnech:**

Z projevů neurotoxicity u tabunem intoxikovaných a neléčených zvířat byly sedmý den po intoxikaci tabunem patrné: snížený svalový tonus, pasivní chování jedinců v kleci a pasivita byla patrná i při manipulaci. Další parametry, které byly hodnoceny jako neuspokojující: záškuby čelistí či přežvykování, zvířata nereagovala na dotyk a jejich snížená aktivita přetrvávala i nadále. Postižení bylo zaznamenáno na úrovni očí, u nichž převládala mírná mióza a zpomalená reakce na světlo. Statisticky významně snížená zůstala síla hrudních i pánevních končetin, vertikální a horizontální aktivita a rektální teplota (Tab. č. 8).

U skupiny již byla jako terapie podán atropin s oximem Ko75 byla zaznamenána významná eliminace mnoha ze zaznamenaných projevů tabunem navozené neurotoxicity. U těchto zvířat byla statisticky snížená aktivita ve volném poli a síla úchopu dolních končetin, rovněž rozteč zadních končetin při dopadu byla významně změněna.

Skupina léčená atropinem v kombinaci s obidoximem vykazala také velmi dobré terapeutické výsledky. Byla zde ale také zaznamenána zvýšená pasivita jedinců. Z dalších námi hodnocených parametrů došlo k významné odlišnosti on kontrolní

skupiny v rozteči při dopadu a síle úchopu horních končetin, která byla mírně snížena.

Po podání atropinu a oximu K074 jako terapie bylo také zaznamenáno výrazné zlepšení oproti skupině bez terapeutického zásahu. Na rozdíl od předešlých skupin jsme zde navíc zaznamenali ještě další postižení na úrovni očí, a to zpomalení reakce na světlo a mírné mydriázy. Naproti tomu u této skupiny zůstaly zachovány normální hodnoty rozteče při dopadu a rovněž síly úchopu horních i dolních končetin.

Jako nejhorší z námi podaných terapeutických kombinací se nám jeví atropin s HI-6, kdy zůstalo mnoho hodnocených parametrů statisticky významně odlišných od kontrolní skupiny. U těchto jedinců byla i po uplynutí sedmi dní zaznamenána pasivita jedinců jak v kleci, při i při vyjímání a práci se zvířaty, která byla podpořena sníženým tonem svalstva. Toto bylo potvrzeno dalšími parametry: snížením explorační aktivity a aktivity ve volném poli. Zároveň přetrvávala zhoršená reaktivita zvířat na dotyk a zvuk. Statisticky významně snížena zůstala také síla končetin a to jak hrudních, tak i pánevních, rozteč při dopadu a rektální teplota. Také reakce na světlo byly zpomaleny a byla potvrzena velmi silná mióza.

#### **4.2 Experiment 2: Porovnání terapeutické účinnosti oximu K075 a trimedoximu vůči intoxikaci tabunem:**

V tomto pokusu přežila všechna zvířata ze skupin, kterým byl podán tabun v dávce 80% LD<sub>50</sub> a aplikována následná terapie obsahující reaktivátor v kombinaci s atropinem. U intoxikované skupiny bez následné terapie uhynuly v průběhu 24 hodiny dvě zvířata a v následujícím týdnu pak další dvě. Výsledná data jsou zanesena v tabulkách 9. a 10.

### **Hodnocení experimentu po 24 hodinách:**

U skupiny, která byla intoxikována tabunem bez následné terapie bylo 31 námi sledovaných parametrů statisticky významně změněno. Navíc bylo zaznamenán oproti výsledkům v předchozí studii výskyt endoftalmu, mírného celkového tremoru a hyperkinéz. Nedošlo k zvýšení nosní sekrece, jako normální zůstal dopad ze zádové polohy zvířete a celková pohyblivost zvířat nebyla snížena. Došlo však k signifikantnímu úbytku váhy jednotlivců.

Jako nejefektivnější z námi sledovaných oximů se nám v tomto časovém stadiu pokusu jevil trimedoxim, u nějž došlo k změně pouze u dvou parametrů. V počtu vzpřímů za 3 minuty, stále ale byl tento parametr méně snížen v porovnání s ostatními léčenými skupinami a úbytku síly v pánevních končetinách.

Oxim K075 a obidoxim byly hodnoceny jako přibližně stejně efektivní, u obidoximu zůstala zachována normální síla úchopu všech končetin a rozteč při dopadu vzhledem k oximu K075. Naproti tomu u oximu K075 byla pozorována normální reakce na dotek tupým předmětem.

Jako nejméně efektivní byl vyhodnocen oxim HI-6, jelikož u něj bylo zaznamenáno nejvíce statisticky významně změněných parametrů, celkem 24.

### **Hodnocení experimentu po 7 dnech:**

Po sedmi dnech došlo u skupin, kterým byla podána terapie k úpravě sledovaných parametrů, k navýšení množství statisticky významně změněných parametrů došlo pouze u skupiny intoxikované Gabunem bez následné terapie, jejich celkový počet byl roven 34. U této skupiny došlo k zhoršení parametrů: hlavně projevů na kůži a srsti, lakrimaci, nosní sekreci, a celkové pohyblivosti zvířete. Naproti tomu bylo zaznamenáno zlepšení některých hodnot, jako jsou

rozteč při dopadu, síla hrudních končetin, tělesné teploty a váhy jednotlivých zvířat ve skupině.

I po 7 dnech se nám jevil trimedoxim jako nejefektivnější, jako jediný signifikantně změněný parametr byla vyhodnocena pouze zvýšená horizontální aktivita. U obidoximu byla také zvýšena.

U oximu K075 bylo zaznamenáno postižení očí, a to na úrovni zpomalené reakce na světlo a přetrvávající mydriázy. Zároveň zůstala velmi snižená celková aktivita jedinců této skupiny.

U oximu HI-6 došlo ve stanoveném časovém rozmezí k úpravě velké části změněných parametrů, stále však zůstalo 8 parametrů vychýlených od normálu.

### **4.3 Experiment 3: Porovnání terapeutické účinnosti vybraných oximů vůči intoxikaci somanem:**

V průběhu tohoto pokusu byla zaznamenána dvě úmrtí ve skupině, které byl podán soman bez následné terapie. Dále pak bylo zjištěno jedno úmrtí ve skupině, kde terapie obsahovala HI-6. Všechna zvířata uhynula v průběhu prvních 24 hodin, v dalších dnech již všechna přežila. Získaná data jsou pak zanesena do tabulek č. 11. a 12.

#### **Hodnocení účinnosti terapie po 24 hodinách:**

U skupiny intoxikované 80% LD<sub>50</sub> somanem bylo zjištěno 15 jednotlivých námi sledovaných ukazatelů neurotoxicity, statisticky významně změněno. Na rozdíl od předešlých pokusů však nedošlo ke změnám projevů reakcí na podněty, což jsou přiblížení, dotyk, bolest. Reakce na světlo však nebyla zjištěna, zvířata vykazovala mírnou mydriázu. Dále nedošlo k statisticky významnému ovlivnění

vertikální a horizontální aktivity při sledování v Animexu, i při sledování zvířat ve volném poli byla jejich aktivita hodnocena také jako normální.

Při hodnocení tohoto pokusu 24 hodin po intoxikaci byl zaznamenán vlastní toxicitní potenciál oximů K074 a K075, podaných v terapii. V těchto skupinách v porovnání se skupinou, které byl podán pouze soman bez následné léčby, došlo k zvýšení množství změřených parametrů. U oximu K074 bylo zaznamenáno navíc snížení aktivity zvířat a to celkové, horizontální i vertikální a zároveň zhoršení reakcí zvířat na přiblížení, dotek a bolest. Stejně zhoršení bylo zjištěno i u oximu K075, nedošlo však k otupění vnímání bolesti, a zároveň byla zaznamenána přemrštěná reakce na zvukový podnět. Zorničky zvířat nereagovaly na přiblížení světelného zdroje a byla zjištěna silná mydriáza.

Při hodnocení účinnosti terapie obsahující obidoxim byly zjištěny také dva jím ovlivněné parametry, jednalo se stejně jako u předešlých dvou o snížení aktivity zvířat ve volném poli, což bylo také potvrzeno pozorováním v Animexu, kdy byla snížena vertikální a horizontální aktivita.

Jako nejlepší byla vyhodnocena terapie obsahující oxim HI-6, kde došlo k vychýlení od standardu pouze u 10 parametrů. Nebylo zde zaznamenáno, na rozdíl od předešlých oximů, postižení očí, zůstala zachována normální reakce na světlo a pupila nevykazovala známky mydriázy. Svalstvo nebylo hypotonické jako u obidoximu a K074, ani atonické jako u K075. Dalšími parametry u kterých došlo k zlepšení byly ataxie a chůze.

### **Hodnocení účinnosti terapie po 7 dnech:**

Po sedmi dnech došlo k výraznému zlepšení námi sledovaných parametrů, u intoxikované skupiny bylo zaznamenáno jen 5 odlišných projevů od normálu. Stále

byla snížena rozteč při dopadu mezi dolními končetinami, toto zjištění bylo dále potvrzeno snížením úchopové síly dolních končetin. U zvířat byla také signifikantně snižena teplota ze standardních 37,7 na 37,0 °C. Dále pak byly také zaznamenány hyperkinézy a křeče.

U oximu K075, který byl po 24 hodinách hodnocen jako toxičtější oproti K074, došlo v průběhu dalších dnů k výraznému zlepšení stavu. Po sedmi dnech byla zaznamenána silná nosní sekrece a snížená síla úchopu všech čtyř končetin, přičemž síla úchopu horních a pánevních končetin byla pouze mírně snižena. Nedošlo však k úpravě stavu očí, a to ani u skupin jímž byl podán obidoxim nebo K074, stále nebyla zaznamenána reakce zvířat na světlo, tento projev byl zaznamenán společně s přetrvávající silnou mydriázou. Přitom u skupiny jenž byla pouze intoxikována, však po uplynutí této doby k úpravě stavu došlo.

Oxim K074 byl vyhodnocen po sedmi dnech jako horší, jelikož oproti K075, bylo u něj zjištěno postižení chůze a síla úchopu pánevních končetin. U obidoximu pak bylo navíc zjištěno ještě pasivní chování jedinců před vlastním handlingem.

Za nejefektivnější byl považován oxim HI-6, u něžž došlo k eliminaci statisticky významně sledovaných parametrů na tři. U zvířat byla pozorována snížená reakce na přiblížení předmětu, ale sledované ukazatele na úrovni očí byly vyhodnoceny jako normální. Dále byla zaznamenána snížená rektální teplota a zúžení rozteče při dopadu mezi pánevními končetinami.

## **5 DISKUSE:**

V této práci byla pro hodnocení neurotoxického účinku způsobeného NPL použita metoda Funkční pozorovací baterie, která obsahuje celkem 47 parametrů, které můžeme jednoduše statisticky hodnotit. V této metodice je sdruženo hodnocení parametrů senzorických, motorických a autonomních nervových funkcí. Jedná se o velmi komplexní a jednoduché hodnocení účinků látek pro přirozené chování živočichů, které nám může mnoho napovědět o funkci jednotlivých úrovní nervového systému organismu.

Výhoda tohoto testování spočívá v tom, že je prováděno na naivních zvířatech. Na druhou stranu jsou ovšem některé parametry obtížněji kvalifikovány a stěžejní podmínkou validity metody je vysoká zkušenost osoby, která pokus provádí (Bureš 1976) a její vysoká zodpovědnost. Pro zachování validity takovýchto pokusů je podmínkou také zachování stávajícího prostředí, ve kterém jsou zvířata ustájena a ve kterém se pokus provádí po celou dobu průběhu testování.

V literatuře bývá často také diskutována otázka, zde je potkan vhodný animální model pro testování účinků organofosfátů. Abou-Donia (2003) uvádí, že ačkoli jsou potkani citliví vůči mnoha toxickým chemickým látkám, nevykazují zřetelné známky otravy organofosfáty. Naproti tomu jiní autoři považují potkany za standardní a vhodné modely pro všechny toxikologické studie včetně akutních, multidávkových, vývojových, reprodukčních, karcinogenních a neurotoxických (Jacobson-Kram 2001).

Výsledná data jednotlivých pokusů prokazují vysokou citlivost laboratorních potkanů na intoxikaci NPL. Ve skupině, které nebyla podána antidotní terapie, bylo mnoho pozorovaných parametrů statisticky významně změněno ve srovnání s



kontrolní skupinou. S přihlédnutím k samotné metodě Funkční pozorovací baterie je potkan s jeho typickými fenotypovými vlastnostmi považován za optimální model ve srovnání s jinými druhy běžně laboratorně používaných hlodavců jako jsou morčata nebo myši (Kunešová 2005). Za velmi výhodné vlastnosti pro toto hodnocení považujeme zejména jejich snadné přivykání na handling, vysokou explorativní aktivitu a anatomickou způsobilost.

Nejspolehlivějších výsledků je dosaženo, jestliže jsou zvířata předem po několik dní handlována, aniž by byla vystavena bolestivým nebo jinak nepříjemným podnětům (Bureš 1976). Zvířata tak mají dostatek času zvyknout si na dotyk ruky examinatora a jeho pach. Proto byla zvířata v tomto pokusu takto připravována již několik dní před vlastním zahájením experimentu.

Funkční pozorovací baterií byly již v minulosti testovány organofosforové inhibitory AChE na několika na sobě nezávislých pracovištích. Jako hlavní ukazatele neurotoxicity byly v těchto studiích uvedeny: tremor, mióza, svalová slabost, snížená motorická aktivita, snížená citlivost na bolest a zvýšená excitabilita, v polovině případů byly ovlivněny sensorimotorické parametry, někdy zvýšená rozteč při dopadu. Z autonomních parametrů byla nejméně často pozorovaná lakrimace (Moser 1995). V dalších pracích pak byly publikovány změny dalších parametrů ovlivněných cholinergním nervovým systémem, a to snížená reakce na bolest (Koehn 1978), přežvykování (Salamone 1990) a hypotermie (Gordon 1994).

Tyto údaje byly potvrzeny i v naší studii. V průběhu prvních dvou pokusů byla zvířata zařazena do skupiny intoxikované tabunem bez následné terapie pasivní a měla statisticky významně sníženou aktivitu, a to jak při pohybu ve volném poli po dobu 3 minut, tak i v průběhu měření horizontální a vertikální aktivity Animexem po dobu 10 minut. Při intoxikaci jinou NPL, somanem, však snížení aktivity

intoxikovaných zvířat nenastalo. Tento jev může být způsoben rozdílnou distribucí této látky v organismu, včetně centrálního nervového systému (Kader 1985).

Snížení aktivity pokusných zvířat při intoxikaci tabunem bylo doprovázeno také snížením svalového tonu, kdy zvířata vykazovala hypotonii a někteří jedinci až atonii. Při otravě somanem byla tato skutečnost zaznamenána také. Rozteč pánevních končetin při dopadu byla signifikantně snižena, a to i u skupin, kterým byla podána po intoxikaci podána kombinovaná terapie, k úpravě tohoto parametru nedošlo u mnoha skupin ani po uplynutí sedmi dní od podání NPL.

V souladu s dříve publikovanými pracemi na dané téma byla u neléčené skupiny intoxikované tabunem zaznamenána silná lakrimace, snížení rektální teploty a významné ovlivnění všech reaktivních parametrů (reakce na přiblížení, na dotyk, na zvuk a bolest). Po intoxikaci somanem však nebyly zaznamenány poruchy při hodnocení těchto výše uvedených reaktivních parametrů po celou dobu trvání pokusu.

Parametr jehož ovlivnění intoxikací tabunem bylo potvrzeno, byla mióza, která byla velmi výrazná a po sedmi dnech ještě nebyla úplně eliminována, i když došlo k jisté úpravě stavu. Zornice zvířat po 24 hodinách nereagovaly na přiblížení světelného zdroje, po 7 dnech již byla patrná zpomalená reakce. Při otravě somanem došlo k naprosté spontánní úpravě těchto parametrů po 7 dnech.

Tremor nebyl u testovaných jedinců po intoxikaci tabunem přítomen po celou dobu pokusu, pouze při testování pokusných zvířat za 24 hodin po intoxikaci. Při otravě druhou NPL, somanem, nebyl zaznamenán ani po uplynutí 24 hodin. V prvním pokusu při intoxikaci tabunem byla navíc zaznamenána nosní sekrece po 24 hodinách, k úpravě tohoto parametru došlo v průběhu dalších dní, takže při opakovaném měření po sedmi dnech již nebyla zjištěna. Při druhém pokusu se

stejnou NPL byla tato sekrece zaznamenána až po sedmi dnech. Po intoxikaci somanem nebyla nosní sekrece zaznamenána.

Pryor (1983) uvádí, že neurotoxické látky snižují sílu úchopu více u pánevních končetin než u hrudních, což autor vysvětluje patologickou progresí otravy NPL. Na základě námi zjištěných výsledků, uvedených v tab. č. 7 až 12, nemůžeme tento názor jednoznačně potvrdit. U skupiny, které byl podán tabun bez následné terapie, došlo k významnému snížení hodnot síly úchopu u pánevních i hrudních končetin a k úpravě těchto hodnot nedošlo ani po uplynutí sedmi dní. Po intoxikaci somanem, bylo po 24 hodinách také zjištěno snížení úchopové síly, po 7 dnech byla snižená síla pouze pánevních končetin.

Po 24 hodinách od intoxikace tabunem i somanem docházelo ke sníženému příjmu potravy zvířaty, což se však statisticky významně neprojevovalo na změně jejich tělesné hmotnosti. Snížení hmotnosti bylo zaznamenáno až při hodnocení po sedmi dnech, ale ani zde nebylo statisticky významné. Úbytek hmotnosti pokusných zvířat je vysvětlován vysokým energetickým výdejem organismu v průběhu akutní intoxikace, která je spojena se svalovými křečemi na jedné straně a s nekomfortním stavem zvířete, nevolností, změněnou emocionalitou, psychologickým stavem a dezorientací na straně druhé (Jacobson-Kram 2001).

V této práci jsme se v počátku zaměřili na porovnání terapeutické účinnosti jednotlivých oximů vůči intoxikaci tabunem, z nichž jsme vybrali HI-6, obidoxim, KO74 a KO75. Vedle běžně dostupných oximů (HI-6, obidoxim) a byly také testovány nově připravené látky KO74 a KO75, které byly syntetizovány na katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové.

Obidoxim je v současné době běžně používaným a komerčně dostupným oximem určeným pro léčbu intoxikací organofosfáty (Dawson 1994). Ačkoli

nevykazuje dostatečnou terapeutickou účinnost v případě otravy somanem (Kassa 1999, Kassa 2000), výsledky dřívějších prací poukázaly na relativně dobrý terapeutický potenciál obidoximu při terapii intoxikace vyvolané tabunem.

Oxim HI-6 byl v minulosti vyvinut a zaveden do praxe některými zeměmi pro jeho vysokou reaktivační a terapeutickou účinnost. Je velmi účinný při eliminaci jednotlivých faktorů neurotoxicity navozené intoxikací somanem (Dawson 1994, Kassa 1995). Tato práce v souladu s předešlými výsledky však potvrdila, že je tato látka méně terapeuticky účinná vůči intoxikaci tabunem než obidoxim.

Terapie akutních otrav vyvolaných nejstarší NPL tabunem, nebyla dosud uspokojivě vyřešena. Obtížná reaktivovatelnost této látky je dána odlišným prostorovým uspořádáním molekulární struktury tabunu. Tato rozdílnost je příčinou snížené reaktivity inhibované AChE s pyridiniovými oximy (Cabal 1999). Důvodem jejich nízké reaktivační schopnosti je přítomnost volného elektronového páru lokalizovaného na amidovém dusíku, která velmi ztěžuje nukleofilní zásah do struktury inhibovaného enzymu (Eto 1976).

V tuto chvíli je obtížné objasnit příčiny vyšší účinnosti obidoximu v porovnání s ostatními testovanými oximy. Tento rozdíl ve schopnosti eliminovat tabunem navozenou neurotoxicitu je zřejmě způsoben odlišností v prostorovém uspořádání užitých oximů a také počtem oximových skupin a jejich pozicí na pyridiniovém jádře (Cabal 1999).

Reaktivační účinnost jednotlivých oximů vůči jednotlivým NPL není shodná. Obidoxim byl vyhodnocen jako nejúčinnější reaktivátor při intoxikaci vyvolané tabunem. Další látkou, která vykazovala dobrou účinnost v tomto pokusu byl nově syntetizovaný oxim KO75.

Na základě výsledků prvního pokusu byl připraven pokus následný, kde byly vybrány jiné reaktivátory. Obidoxim, jako nejlépe hodnocený z dřívějšího pokusu,

jako určitý vnitřní standard, který se snažíme překonat. HI-6 jako standard neúspěšného oximu vůči intoxikaci tabunem. KO75, který byl hodnocen jako nejúčinnější nový oxim, tedy k ověření jeho účinnosti. Jako poslední oxim byl zařazen trimedoxim, u nějž se na základě znalostí vlivu chemické struktury na reaktivační aktivitu usuzovalo na dobrý terapeutický efekt (Cabal 2004).

Nově syntetizovaný oxim KO75 však v tomto testu nepotvrdil roli účinného reaktivátoru AChE, jak by se dalo usuzovat na základě znalostí předešlého výsledku. Jeho účinnost byla sice po 7 dnech srovnatelná s účinností obidoximu, což bylo prokázáno v prvním z řady pokusů, ale nedosáhla velmi dobrého terapeutického efektu trimedoximu. Na základě výsledků tohoto testu bude do výzbroje AČR nově zavedena látka trimedoxim, která nahradí stávající reaktivátor obidoxim, jakožto účinnější antidotum vůči otravě tabunem.

Posledním pokusem byly testovány nově syntetizované reaktivátory KO74 a KO75, vůči jiné NPL, somanu. Z dříve uskutečněných pokusů na katedře toxikologie je jako nejlepší v současnosti známý reaktivátor vůči této NPL považován oxim HI-6 (Kassa 2002). Tento pokus také prokázal, že obidoxim ani trimedoxim nejsou vůči otravě touto látkou dostatečně účinné.

Nově syntetizované oximy KO74 a KO75 však neprokázaly lepší terapeutickou účinnost než oxim HI-6, přičemž ani tento nejefektivnější oxim neeliminovat všechny somanem způsobené projevy neurotoxicity. Oblast terapie akutních intoxikací somanem zůstává i nadále otevřená novým přístupům a testováním. Faktem však je, což potvrzují i tyto pokusy, že v současné době neexistuje univerzální či širokospektrý reaktivátor AChE, kterým by bylo možné eliminovat akutní toxické účinky všech NPL.

V této práci byla hodnocena účinnost jednotlivých reaktivátorů, které byly podávány vždy v kombinaci s atropinem. Atropin je v terapii běžně užívaná anticholinergní látka, u které výrazně převažuje působení na muskarinové receptory na periférii, poměrně méně působí v centrálním nervovém systému, protože velmi obtížně prochází přes hematoencefalickou bariéru. Prakticky vůbec neovlivňuje receptory nikotinové ve vegetativních gangliích a nervosvalové ploténce (Bajgar 1991). Proto se toto antidotum podává s cílem antagonizovat salivaci, bronchiální sekreci a bronchokonstrikci, zatímco kosterní svalstvo, včetně svalů respiračních, zůstávají touto látkou neovlivněny a tedy paralyzovány (Vopršalová 1996).

Pro další zlepšení již nastavené antidotní terapie lze v následujících pokusech navrhnout nahrazení anticholinergika atropinu, za anticholinergikum s výraznějším centrálním účinkem. Mezi tyto látky patří benaktyzin, který je již v AČR zaveden. Na základě experimentálních výsledků lze do této skupiny také zařadit látky biperiden a skopolamin. Kunešová (2005) konstatuje na základě výsledků své práce, že všechna touto studií testovaná anticholinergika s výraznějším centrálním působením (benaktyzin, biperiden, skopolamin) v kombinaci s jakýmkoli oximem vedla k zvýšení ochrany zvířat proti projevům NPL způsobené neurotoxicity a jejich neuroprotektivní efekt byl silnější než účinek terapie obsahující atropin. Mezi těmito testovanými centrálně působícími anticholinergiky se pak jevil jako nejúčinnější biperiden.

Dále by bylo žádoucí doplnit stávající terapii obsahující oxim a anticholinergikum, látkou s antikonvulzivním účinkem, nejčastěji je v této indikaci používán diazepam, a to z důvodu malé schopnosti atropinu zabránit centrálním záchvatům vedoucím k tonicko – klonickým křečím.

Avšak ani optimální nastavení terapie skládající se z reaktivátoru acetylcholinesterázy, anticholinergika a antikonvulziva nemusí úspěšně odvrátit

hrozbu poškození organismu nebo úmrtí, zvláště v případě expozice organismu vyšším dávkám NPL.

K dalšímu zmírnění nežádoucích účinků těchto látek je vhodné doplnit již rozšířenou terapii profylakticky působící látkou, protože tabunem a somanem navozené toxické účinky jsou mimořádně odolné vůči následným terapeutickým zásahům. Toto je vysvětlováno nízkou reaktivační účinností v současnosti používaných oximů vůči tabunu (Clement 1987, Jokanovic 1996, Puu 1986) a velmi krátkým časovým intervalem potřebným k dealkylaci komplexu AChE a somanu.

Podání oximů v kombinaci s běžně užívanou anticholinergní látkou atropinem vedlo k snížení projevů některých neurotoxických účinků testovaných NPL, ale část námi hodnocených parametrů nebyla zcela eliminována a byla posuzována, jako statisticky významně odlišná od normálních hodnot. Proto by pro další zlepšení účinnosti antidotní terapie bylo potřebné podat některá profylakticky působící léčiva, hlavně oximy, protože přítomnost jakéhokoli množství reaktivátoru v krevním oběhu před otravou nervově paralytickými látkami je velkým přínosem pro následnou antidotní léčbu.

## **6 ZÁVĚR:**

V této práci jsme hodnotili experimentálně navozenou neurotoxicitu tabunem a somanem, organofosfáty řazenými do skupiny nervově paralytických látek, které jsou velmi toxické pro všechny teplokrevné organismy. K hodnocení výsledků jsme použili soubor vybraných parametrů, zařazených do komplexní metodiky zvané Funkční pozorovací baterie, tato baterie obsahovala celkem 47 námi hodnocených parametrů motorických, senzitivních a autonomních nervových funkcí.

NPL byly experimentálním zvířatům podávány intramuskulárně v dávce odpovídající 80% LD<sub>50</sub>. Byla-li podávaná následná terapie, byla aplikována také intramuskulárně vždy 1 minutu po intoxikaci tabunem. Výsledné parametry pak byly hodnoceny ve dvou časových intervalech: 24 hodin a 7 dní po podání otravné látky.

Terapie byla vybrána na základě v minulosti provedených pokusů, jako srovnávací standardy byly vybrány vždy oximy HI-6 a obidoxim a to z důvodu jejich dostupnosti v terapii a odlišných terapeutických schopností. Nejlepší běžně používaný reaktivátor pro intoxikaci tabunem je obidoxim. Oxim HI-6 je účinný při terapii intoxikace ostatními NPL, zvláště pak somanem. Dále byla v této práci porovnávána terapeutická účinnost dvou nově syntetizovaných oximů K074 a K075 a oximu, který je dostupný, ale málo používán – trimedoximu.

Oximy byly vždy podávány v ekvimolárních množstvích. Terapie obsahovala mimo tyto oximy i anticholinergně působící látku. Jako anticholinergně působící látka byl vybrán běžně v terapii otrav organofosfátů užívaný atropin.

Terapie eliminovala mnoho tabunem navozených projevů neurotoxicity, avšak žádná v terapii použitá látka neeliminovala tyto projevy absolutně. Dle našeho očekávání nejhorší výsledky vykázal vůči tabunu oxim HI-6. Nově syntetizované



látky vykazovaly lepší terapeutickou účinnost, jako velmi nadějná látka se nám jevil oxim K075, jehož účinek po uplynutí 24 hodin a 7 dní byl srovnatelný s účinkem obidoximu. U oximu K074 nedošlo k tak výrazné úpravě námi sledovaných parametrů.

Výsledky této práce však byly jenom předběžné vzhledem k malému souboru potkanů a interindividuální variabilitě zvířat obecně. Další studie pak měla ověřit výsledky získané v prvním z řady pokusů. Do této studie byla zařazena látka K075, a méně úspěšná látka K074 byla nahrazena trimedoximem. Data získaná v předešlém testu byla potvrzena, K075 má obdobnou terapeutickou účinnost vůči intoxikaci tabunem jakou vykazuje obidoxim. Avšak ani jedna z těchto látek nedosáhla terapeutické účinnosti trimedoximu. Na základě výsledku této studie byla tato látka navržena k zavedení do antidotní výbavy AČR, kde by mohla nahradit stávající obidoxim.

V posledním pokusu byly látky K074 a K075 testovány vůči jiné otravné látce, somanu. U nových reaktivátorů a taktéž u obidoximu došlo spíše k potenciaci účinku NPL a na základě hodnocených parametrů, bylo prokázáno vyšší zatížení organismu, které se projevilo zvláště zhoršenou reaktivitou na okolní podněty, sníženou aktivitou zvířat a postižením očí. Tento efekt nebyl zaznamenán u oximu HI-6, který naopak způsobuje výrazné snížení projevů neurotoxicity vyvolané somanem.

## **7 PODĚKOVÁNÍ:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat lidem, kteří přispěli ke vzniku této práce. Jsou to hlavně mí školitelé: Prof. MUDr. Jiří Kassa, CSc. který mi pomohl mnoha cennými radami při přípravě nejen této rigorózní práce, ale mimo jiné také uvedením do problematiky týkající se nervově paralytických látek, a také PharmDr. Marii Vopršalové, CSc.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Kamilu Kučovi, PhD. a Mgr. Danielovi Junovi, PhD. za poskytnutí materiálů, vysvětlení problematiky oximových reaktivátorů, připomínkovaním a závěrečnou korekci této práce.

Děkuji také paní Evě Reslové za pečlivé a svědomité provedení laboratorního pokusu a vysvětlení průběhu a hodnocení výsledků Funkční pozorovací baterie a všem, kteří zde nejsou uvedeni, ale poskytli mi cenné rady pro zpracování práce, nebo mi jakýmkoliv způsobem pomohli.

Autorka

## **8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:**

ABOU-DONIA, M. B. *Neurotoxicity*. 1st ed. Boca Raton (USA): CRC Press, 1992, p. 621.

ABOU-DONIA, M. B. *Organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2003, vol. 58, no. 8, p. 511 – 548.

BAJGAR, J. *Historie používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu*. Hradec Králové: Učební texty VLA JEP, (ed. PAČES, J.), 302, 1996, p. 4 – 22.

BAJGAR, J. *Organophosphates/nerve agent poisoning: Mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment*. Advances in Clinical Chemistry, 2004, vol. 38, p. 151 – 216.

BAJGAR, J. – FUSEK, J. – HRDINA, V. *Vojenská toxikologie*. Hradec Králové: Učební texty VLA JEP, (ed. KVĚTINA, J.), 260, 1991, p. 14 – 42.

BALASUBRAMANIAN, A. S. *Amyloid beta peptide processing, insulin degrading enzyme and butyrylcholinesterase*. Neurochemical Research, 2001, vol. 26, p. 453 – 456.

BARAK, D. – ORDENTLICH, A. – BROMBERG, A. – KRONMAN, C. et al. *Biochemistry*, 1995, vol. 34 (47), p. 15444.

BRABEC, V. – VACHEK, J. *Profylaktické antidotum proti NPL – PANPAL (tablety)*. Zpravodaj vojenské farmacie, 2000, vol. 3, p. 11 – 12.

BRITO, G. N. O. – DAVIS, B. J. – STOPP, L. C. – STANTON, M. E. *Memory and septohippocampal cholinergic system in the rat*. Psychopharmacology, 1983, vol. 81, p. 315 – 320.

- BUREŠ, J. – BUREŠOVÁ, O. – HUSTON, J. *Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior*. 1<sup>st</sup> ed. Amsterdam: Elsevier, 1976, p. 277.
- CABAL, J. – BAJGAR, J. *Tabun – návrat po padesáti letech*. Chemické listy, 1999, vol. 93, p. 27 – 31.
- CABAL, J. – KUČA, K. – KASSA, J. *Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase*. Pharmacology and Toxicology, 2004, vol. 95, p. 81 – 86.
- CLEMENT, J. G. – SHILOFF, J. D. – GENNINGS, C. *Efficacy of a combination of acetylcholinesterase reactivators, HI-6 and obidoxime, against tabun and soman poisoning in mice*. Archives of Toxicology, 1987, vol. 61, p. 70 – 75.
- DAVISON, A. N. *Return of cholinesterase activity in the rat after inhibition by organophosphorus compounds*. Biochemical Journal, 1955, vol. 60, p. 339 – 346.
- DAWSON, R. M. *Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning*. Journal of Applied Toxicology, 1994, vol. 14, p. 317 – 331.
- DOUGHERTY, D. A. – STAUFFER, D. A. Science, 1990, vol. 250, p. 1558.
- EDDLESTON, M. *Patterns and problems of deliberate selfpoisoning in the developing world*. Quaterly Journal of Medicine, 2000, vol. 93, p. 715 – 731.
- ETO, M. *Organophosphorus pesticides: Organic and biological chemistry*. Cleveland (USA): CRC Press Inc., 1976, p. 142.
- FRANTÍK, E. – HORNYCHOVÁ, M. *Clustering of neurobehavioral measures of toxicity*. Homeostasis in Health and Diseases, 1995, vol. 36, p. 19 – 25.
- GORDON, C. J. *Thermoregulation in laboratory mammals and humans exposed to anticholinesterase agents*. Neurotoxicology and Teratology, 1994, vol. 16, p. 427 – 453.

HARTL, J. et al. *Farmaceutická chemie II/1*. Praha: Karolinum, 2001, p. 47-54.

HIROTA, S. A. *A quick guide to muscarinic acetylcholine receptors*. *Biopharmaceutics Journal*, 2001, vol. 5, p. 6 – 8.

CHILDS, A. F. – DAVIES, D. R. – GREEN, A. L. – RUTLAND, J. P. *The reactivations by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organophosphorus compounds*. *British Journal of Pharmacology*, 1955, vol. 10, p. 462 – 465.

JACOBSON-KRAM, D. – KELLER, K. A. *Toxicology testing handbook*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001, p. 428.

JONANOVIC, M. et al. *Oxime-induced reactivation of acetylcholinesterase inhibited by phosphoramidates*. *Toxicology Letters*, 1996, vol. 85, p. 35 – 39.

KADAR, T. – RAVEH, L. – COGEN, G. – OZ, N. – BARANESS, I. – BALAN, A. *Distribution of <sup>3</sup>H-soman in mice*. *Arch. Toxicology*, 1985, vol. 58, p. 545 – 549.

KARRALLIEDDE, L. – SENANAYAKE, N. *Organophosphorus insecticide poisoning*. *Journal of International and Federal Clinical Chemistry*, 1999, vol. 11, no. 2, p. 4 – 9.

KASSA, J. *Comparison of efficacy of two oximes (HI – 6 and obidoxime) in soman poisoning in rats*. *Toxicology*, 1995, vol. 101, p. 167 – 174.

KASSA, J. *Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents*. *Journal of Toxicology*, 2002, vol. 40, p. 803 – 816.

KASSA, J. – CABAL, J. *A comparison of the efficiency of a new asymmetric bispyridium oxime BI – 6 with currently available oximes and H oximes against soman by in vitro and in vivo methods*. *Toxicology*, 1999, vol. 132, p. 111 – 118.

KASSA, J. – KOUPILOVÁ, M. *Neuroprotective effects of currently used antidotes in soman-poisoned rats*. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2000, vol. 67, p. 663 – 668.

KASSA, J. – KRS, O. – CABAL, J. *Základy vojenské toxikologie o ochrany proti BChL: pro posluchače VLA JEP farmaceutického směru*. Hradec Králové: Učební texty VLA JEP, (ed. PAČES, J.), 1993, p. 37 - 50.

KOEHN, G. L. – KARZMAR, A. G. *Effect of diisopropyl phosphofluoridate on analgesia and motor behavior in the rat*. Progress in Neuro – Psychopharmacology, 1978, vol. 2, p. 169 - 177.

KOELLE, G. B. *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*. Handbud der experimentellen Pharmakologie. Berlin: Spring – Verlag, 1963.

KUNEŠOVÁ, G. *Hodnocení efektivity terapie experimentální intoxikace tabunem na základě neurobehaviorálních metod*. Doktorská dizertační práce, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, 2005, p. 5 –53.

KUTTY, K. M. – PAYNE, R. H. *Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism*. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 1994, vol. 8, p. 247 -250.

LAMKA, J. – DUCHÁČEK, L. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Praha: Karolinum, 1998, p. 77.

LAYER, P. G. – WILLBOLD, E. *Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease*. Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 1995, vol. 29, p. 1 – 94.

LE NOVERE, N. – CORRINGER, P-J. – CHANGEUX, J-P. *The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences*. Journal Neurobiology, 2002, vol. 53, p. 447 –456.

LINCOVÁ, D. – FARGHALI, H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén a Karolinum , 2002, p. 98 – 136.

LÚLLMAN, H. – MOHR, K. – WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada Publishing, a. s., 2004, p. 595 - 598.

MAJEWSKI, M. – SEFARIN, B. *Wiadomosci Chemiczne*, 1979, vol. 33, p. 75.

MARTÍNKOVÁ, J. et al. *Vybrané kapitoly z farmakologie*. Hradec Králové: Učební texty, 2002, p. 8.

MASSOULIE, J. – PEZZEMENTI, I. – BON, S. – KREJCI, E. –VALLETTE, F.M. *The molecular and cellular biology of cholinesterase*. *Progressive neurobiology*, 1993, vol. 41, p. 31 - 91.

MORITA, H. et al. *Sarin poisoning in Matsumoto*. *Japanese Lancet*, 1995, vol. 346, no. 8970, p. 290 – 293.

MOSER, V.C. et al. *Comparison of chlordimeform and caryaryl using a functional observational battery*. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1988, vol. 11, p. 139 – 206.

MOSER, V. C. – CHEEK, M. B. – MacPHAIL, R. C. *A multidisciplinary aproach to toxical screening*. III. Neurobehavioral toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1995, vol. 45, p. 173 – 210.

NAGAO, M. – TAKATORI, T. – MATSUDA, Y. et al. *Definitive evidence for the acute sarin poisoning in diagnosis in the Tokyo subway*. *Toxicology Applied Pharmacology*, 1997, vol. 144, p. 198 – 203.

NEVŠÍMALOVÁ, S. – RŮŽIČKA, E. – TICHÝ, J. et al. *Neurologie*. Praha: Galén, 2002, p. 187.

OHBU, S. et al. *Sarin poisoning on Tokyo subway*. Southern Medicinal Journal, 1997, vol. 90, p. 587 – 593.

PALACIOS, J. M. – BODDEKE, H. W. – POMBO-VILLAR, E. *Cholinergic neuropharmacology: an update*. Acta Psychiatrica Scandinavian Suppl., 1991, vol. 366, p. 27 – 33.

PATOČKA, J. et al. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada Publishing, 2004a, p. 30 – 44.

PATOČKA, J. – KUČA, K. – JUN, D. *Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body*. Acta Medica (Hradec Králové), 2004b, vol. 47, p. 215 – 228.

PATON, W. D. – ZAIMIS, E. *The methoinum*. Pharmacological Review, 1952, vol. 4, p. 219 – 253.

PROKEŠ, J. et al. *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Praha: Galén a Karolinum, 2005, p. 169 -173.

PRYOR, G. T. et al. *Assessment of chemicals using a battery of neurobehavioral tests: a comparative study*. Neurobehavioral Toxicology and Teratology, 1983, vol. 5, p. 91 – 117.

PRYMULA, R. et al. *Biologický a chemický terorismus: Informace pro každého*. Praha: Grada Publishing, 2002, p. 94 – 122.

PUU, G. – ARTURSSON, E – BUCHT, G. *Reactivation of nerve agent inhibited acetylcholinesterase by HI – 6 and obidoxime*. Biochemical Pharmacology, 1986, vol. 35, p. 1505 – 1510.

RIEGER, F. – VIGNY, M. *Solubilization and physiochemical characterization of rat brain acetylcholinesterase: Development and maturation of its molecular forms*. Journal of Neurochemistry, 1976, vol. 27, p. 121 – 129.



SALAMONE, J. D. et al. *Lateral striatal cholinergic mechanism involved in oral motor activities in the rat*. Psychopharmacology, 1990, vol. 102, p. 529 – 534.

SCARPETO, H. M. – DMOCHOWSKI, R. R. *Muscarinic receptors: what we know*. Current Urology Reports, 2003, vol. 4, p. 421 – 428.

SCHRADER, G. *Organische Phosphor – Verbindungen als neuartige Insekticide*. Angew. Chemistry, 1950, vol. 62, p. 471 – 473.

SCHWARZ, M. – GLICK, D. – LOEWENSTEIN, Y. – SOREQ, H. *Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons*. Pharmacology & Therapeutics, 1995, vol. 67, p. 283 – 322.

TILSON, H. A. – MOSER, V. C. *Comparison of screening approaches*. Neurotoxicity, vol. 1992, p. 1 – 14.

TROJAN, S. et al. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, 2003, p. 649 – 655.

VANDEKAR, M. – HEATH, D. F. *The reactivation of cholinesterase after inhibition in vivo by some dimethyl phosphate esters*. Biochemical Journal, 1957, vol. 67, p. 202 – 208.

VOLPICELLI, L. A. – LEVEY, A. I. *Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus*. Progress in Brain Research, 2004, vol. 145, p. 59 – 66.

VOPRŠALOVÁ, M. – ŽÁČKOVÁ, P. *Základy toxikologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1996, p. 144 – 150.

WILSON, I. B. *Acetylcholinesterases. IX. Reversibility of tetraethylpyrophosphate inhibition*. Journal of Biological Chemistry, 1951, vol. 190, p. 111 – 117.

WILSON, I. B. – GINSBURG, S. *Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphates*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1955, vol. 54, p. 269 – 271.

ZAJTCHUK, R. – BELLAMY, R. F. *Medical aspects of chemical and biological warfare*. Office of the Surgeon General, Department of the Army. USA, p. 721.

## **9 PŘILOŽENÁ LITERATURA:**