

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**HODNOCENÍ ÚČINNOSTI KVARTÉRNÍCH
REAKTIVÁTORŮ ACETYLCHOLINESTERASY IN VIVO**

Diplomová práce

Vedoucí práce: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Školitel-specialita: kpt. PharmDr. Vendula Hepnarová, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Michaela Mackurová

Čestné prohlášení:

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

V Hradci Králové dne:

.....

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala PharmDr. Marii Vopršalové CSc. za cenné rady a podporu a především kpt. PharmDr. Vendule Hepnarové, Ph.D. za trpělivost, věnovaný čas, vstřícnost a ochotu pomoci při práci v laboratoři, během konzultací a sepisování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Vypracováno na: Univerzita obrany v Brně, Fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Katedra toxikologie a vojenské farmacie

Studentka: Michaela Mackurová

Vedoucí práce: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Školitel-specialista: kpt. PharmDr. Vendula Hepnarová, Ph.D.

Název diplomové práce: Hodnocení účinnosti kvartérních reaktivátorů acetylcholinesterasy in vivo

Nervově paralytické látky patří mezi organické sloučeniny fosforu a jsou velmi častou příčinou otrav v důsledku zneužití jako bojových plynů. Mohou být absorbovány různými cestami – inhalačně, enterálně nebo transdermálně. Problémem je nedostatečná účinnost terapie a stále neexistuje širokospektré léčivo proti různým organofosfátům pronikající do CNS.

Cílem této práce bylo stanovit a porovnat účinek reaktivity nově připravených oximů K869 a K870 se zavedenými oximy K160 a HI-6 při intoxikaci sarinem.

Pokus probíhal na samcích laboratorního potkana kmene Wistar. Hodnoty byly naměřeny spektrofotometricky metodou dle Ellmana. Výsledky byly následně vyhodnoceny v procentech reaktivity acetylcholinesterasy inhibované sarinem v krvi, mozku a bránici potkanů.

Zjistili jsme, že K869 a K870 mají nižší schopnost reaktivity než současně používaný HI-6. Nově připravené oximy proto tedy nejsou vhodnější k terapii otravy sarinem než již zavedený standard.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Performed at: University of defence in Brno, Faculty of Military Health Sciences in Hradec Králové, Department of Toxicology and Military Pharmacology

Student: Michaela Mackurová

Leader of diploma thesis: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Supervisor: kpt. PharmDr. Vendula Hepnarová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Evaluation of the efficacy of quarternary acetylcholinesterase reactivators in vivo

NPL belongs to compounds of organic phosphorus and they are very common cause of poisoning as organophosphorus nerve agent. They can be absorbed by various routes - inhaled, ingest or by transdermal penetration. The problem is ineffective therapy and there is still no broad-spectrum reactivator able to efficiently restore AChE activity after intoxication by various organophosphates that will penetrates into CNS.

The main aim of this experiment was to determine and compare the reactivating efficacy of two newly developed oximes K869 and K870 with commonly used oximes K160 and HI-6 against intoxication of sarin.

The activity of reactivation was determined by standard spectrophotometric Ellman's method with using male Wistar laboratory rats. The results were evaluated as percentage of reactivation acetylcholinesterase inhibited by sarin in rat's blood, brain and diaphragm.

In conclusion, we find out, that oximes K869 and K870 are less efficient in comparison with currently used HI-6. Therefore newly synthesized oximes cannot be recommended for the treatment.

Obsah

Úvod	1
1. Acetylcholin a cholinergní transmise	3
1.1 Acetylcholinové receptory	5
1.2 Cholinesterasy	8
1.2.1 Acetylcholinesterasa	8
1.2.2 Butyrylcholinesterasa	11
2. Inhibitory AChE	12
2.1 Nervově paralytické látky	13
2.1.1 Farmakokinetika NPL	16
3. Antidota AChE	17
3.1 Profylaktická léčba	17
3.2 Léčba po zasažení NPL	18
3.2.1 Reaktivátory	19
4. Cíl	24
5. Metodika	25
5.1 Princip metody	25
5.2 Chemikálie	27
5.3 Zvířata	28
5.4 Kalibrační řada	29
5.5 Postup stanovení měření	29
5.6 Uspořádání pokusů	31
6. Výsledky	34
7. Diskuze	41
8. Závěr	47

Úvod

Acetylcholin (ACh) je neuromediátor, který je široce rozšířen v CNS a podílí se na přenosu vzruchů v centrálním i periferním nervovém systému. Je tvořen z cholinu a acetylkoenzymu A (acetyl Co-A) v presynaptické části neuronu. Ovlivňuje membránové nikotinové (nAChR) a muskarinové receptory (mAChR) a po vyplavení do synaptické štěrbině je hydrolyzován enzymem acetylcholinesterasou (AChE), čímž je ukončen přenos nervového vzruchu. Produkty, vzniklé rozpadem ACh jsou cholin, který se vrací zpět do presynaptické části a slouží opět jako výchozí látka pro syntézu ACh a acetát, který je dále metabolizován.

Látky, které zabraňují správné funkci AChE a zvyšují množství ACh v synaptické štěrbině, našly uplatnění jako pesticidy (paraoxon, parathion) či v léčbě onemocnění jako je Myastenia gravis (MG) - pyridostigmin nebo Alzheimerova choroba (galantamin). Tyto inhibitory AChE patří mezi inhibitory reverzibilní. Další skupinou inhibitorů AChE jsou ireverzibilní, které se na AChE váží kovalentní vazbou. Mezi ireverzibilní inhibitory AChE patří skupina látek označována jako organofosfátové (OFI), které jsou odvozeny od kyseliny fosforečné či fosfonové. Sloučeniny tohoto typu jsou známé jako bojovné otravné látky (BOL).

Nejnebezpečnější skupinou bojových chemických látek jsou nervově paralytické látky (NPL). Vyznačují se specifickým a rychle se patofyziologicky projevujícím efektem, schopností zasáhnout vysoký počet intoxikovaných na poměrně velké ploše. Problém použití chemických zbraní je v mnoha směrech aktuálnější v současnosti než před mnoha lety. (Patočka J. et al 2004) Například úmyslné otravy organofosforovými pesticidy jsou problémem zejména v rozvojových zemích a jsou příčinou úmrtí asi 300 000 lidí ročně. (Eyer, 2003) Dostupnost cílené lékařské péče je obtížná a otravy mají fatální důsledky. Výroba chemických zbraní a jejich užití jsou dnes striktně regulovány řadou mezinárodních úmluv, přesto nelze jejich zneužití zcela zabránit.

Základem léčby po zasažení OFI je antidotní terapie, kterou je nutno zahájit co nejdříve. Mezi funkční antidota jsou řazena anticholinergika v čele s atropinem, který antagonizuje účinek nahromaděného ACh zejména na periférii, huře pak zmírňuje centrální příznaky, neboť obtížně přechází skrz hematoencefalickou bariéru (HEB).

Kauzální antidota jakožto reaktivátory AChE obnovují aktivitu inhibované AChE. Praktický význam mají zejména oximy, což jsou mono- nebo biskvarterní pyridinové sloučeniny s jednou či více oximovými skupinami. Aby oximy byly schopné vytěsnit OFI z AChE, musí mít určitou míru afinity k tomuto enzymu, která je vyjádřena inhibičním potenciálem. Afinitu reaktivátoru k inhibované AChE ovlivňuje několik faktorů: přítomnost kvarterního dusíku v molekule reaktivátoru, délka a síla vazby mezi dvě pyridiniovými kruhy, přítomnost oximové skupiny, poloha oximové skupiny na pyridinovém kruhu a také počet oximových skupin, které se nachází v molekule reaktivátoru.

Praktický význam našly především oximy s kvartérním dusíkem v molekule, u kterých je však limitován prostup do CNS a působí převážně na periférii.

Ačkoliv vývoj reaktivátorů započal v padesátých letech 20. století, je nutno podotknout, že v současnosti neexistuje žádný univerzální reaktivátor schopný reaktivovat AChE inhibovanou všemi NPL či OP pesticidy – tzv. širokospektrý reaktivátor. Dalším problémem je, že řada NPL je vůči běžné antidotní terapii poměrně rezistentní. Jednou z nejobtížněji léčitelné otravy je akutní intoxikace tabunem. Přestože tabun (ethyl N,N-dimethylfosforamidokyanát) patří mezi nejstarší NPL, antidotní terapie akutních otrav touto noxou nebyla dosud uspokojivě vyřešena. Proto se přistupuje k syntetizování a testování řady nových reaktivátorů, jejichž struktura byla modifikována pro zvýšenou reaktivační účinnost. Reaktivační schopnost nových nukleofilů je vyšší ve srovnání se standardy (pralidoxim, obidoxim, methoxim).

Chemické zbraně jsou až překvapivě snadno dostupné, a přitom velmi účinné. Jedná se tedy o vysoce aktuální problematiku. Výsledky prací, zaměřených na reaktivaci OFI se promítnou do zlepšení ochrany před účinkem těchto látek, které neustále představují riziko zneužití teroristy (chemický terorismus), jak v minulosti ukázaly teroristické útoky na japonské metro v Tokiu v roce 1995, rok před tím v Matsumotu a nebo v roce 2013 v Sýrii. (Masuda, 1995)

1. Acetylcholin a cholinergní transmise

Všechny známé synapse lze rozčlenit do určitých skupin, a to na synapse interneuronální, neuroefektorové a neuroreceptorové. U vyšších obratlovců je synaptický přenos zprostředkován převážně chemickou cestou skrz mediátor (neurotransmitter), jedná se v tomto případě o synapse chemické a synaptický kontakt je uskutečněn mezi presynaptickou a postsynaptickou částí neuronu, které jsou odděleny úzkou synaptickou štěrbinou. Do skupiny chemických synapsí spadá také kontakt mezi motorickým nervovým vláknem a vláknem svalovým, který se označuje jako nervosvalová ploténka. Podle typu uvolněného mediátoru a funkčního typu synapse lze předpokládat děje spojené s propustností membrány pro sodné ionty či zvýšenou propustnost membrány pro ionty draselné a chloridové. První případ otevření Na^+ kanálů vede k depolarizaci a vzniku excitačního postsynaptického potenciálu (EPSP), který z funkčního hlediska představuje excitační synapsi. U iontů chloridových a draselných tento jev vede k hyperpolarizaci a vzniku inhibičního postsynaptického potenciálu (IPSP). Jedná se o synapsi inhibiční. (Trojan et al., 2003)

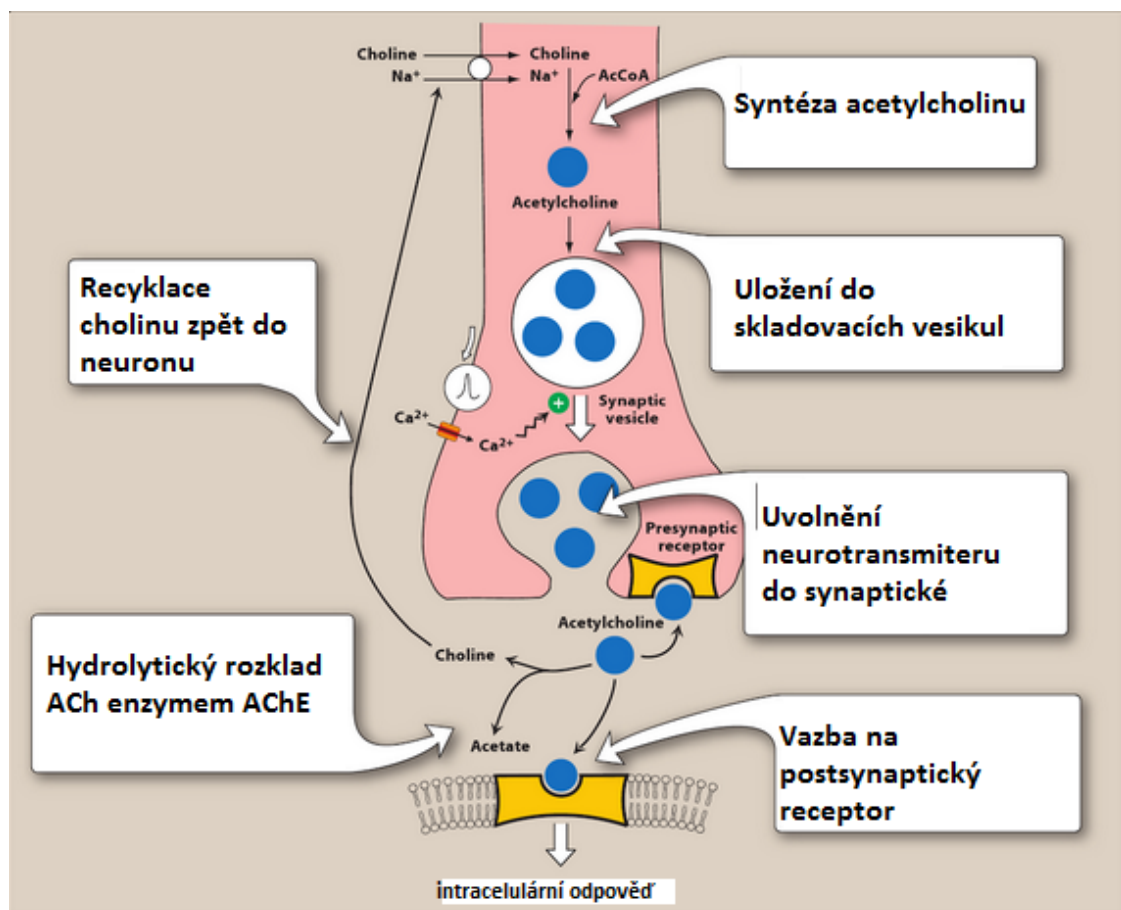
Pro naše účely je důležitá chemická synapse prostřednictvím nízkomolekulárního neurotransmiteru acetylcholinu (ACh), jedná se o synapsi cholinergní. ACh je molekula umožňující přenos informace mezi buňkami formou chemického vedení vzruchu z neuronu na neuron. Je uvolňován z nervového presynaptického zakončení do synaptické štěrbině a jeho odpověď se projeví buď v postsynaptickém zakončení dalšího neuronu, anebo na membráně buněk cílového orgánu. Může také působit na receptory v presynaptické části, kdy většinou inhibuje uvolňování dalších neurotransmiterů.

Cholinergní synapse lze nalézt v organismu především v gangliích parasymptiku a postgangliových periferních spojeních parasymptiku s příslušným orgánem, v gangliích symptiku, sekrečních vláknech dřeně nadledvin, dále také na nervosvalové ploténce (spojení mezi somatickým nervem a kosterním svalem) a důležité cholinergní synapse lze nalézt i v CNS. (Martínková, 2007)

Syntéza ACh probíhá v cytoplazmě neuronů z cholinu a Acetyl-CoA enzymem cholinacetyltransferasou, který je zodpovědný za přenos acetylu na cholin. Vzniklý ACh je skladován v synaptických vezikulech. Množství ACh v jednom synaptickém váčku se nazývá kvantum a kolísá od 1 000 do 50 000 ACh molekul. (Amber, 2010)

Jednotlivá kvanta ACh jsou spontánně vypuzována a množství uvolněného neurotransmiteru je úměrné množství kalciových kanálů, které vstoupily do cytoplazmy nervového zakončení. (Lincová, 2002)

Uvolnění ACh probíhá na základě impulsu šířícího se po nervovém vlákne. Vápenaté ionty vstoupí do neuronu kalciovým kanálem, který se otevírá vlivem depolarizace nesynaptické membrány. Vzestup koncentrace vápenatých iontů spouští splnutí váček s presynaptickou membránou a následně dochází k vyprázdnění vezikul s neuropřenašečem do štěrbin, který se váže na acetylcholinové receptory (AChR) na postsynaptické membráně. Kalciový kanál se uzavírá vlivem negativní zpětnovazební regulace zprostředkované poklesem aktivity adenylátcyklyasy a tvorby cAMP, spuštěné aktivací muskarinových receptorů umístěných na presynaptické membráně. Naopak nikotinový receptor umístěný na presynaptické části somatického nervového vlákna urychluje uvolňování ACh. (Martínková, 2007)



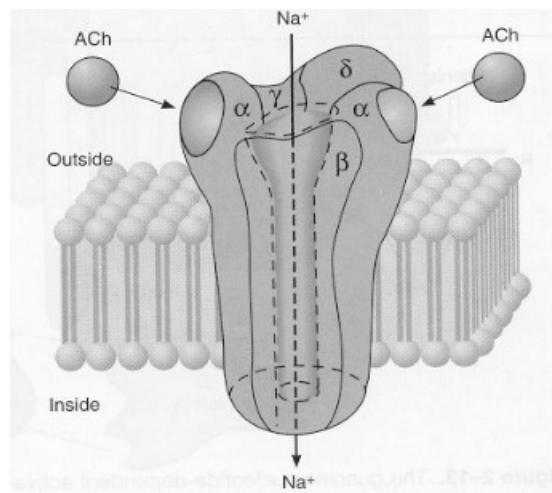
Obr. 1 : Syntéza a uvolnění AChE při cholinergní transmissi

Převzato a upraveno podle Clark et al. (2001)

1.1 Acetylcholinové receptory

ACh působí na dva základní typy membránových receptorů, nazývaných podle přírodních látek, které jsou jejich přímými agonisty. Muskarinový receptor (mAChR) je aktivovaný muskarinem z muchomůrek a nikotinový receptor (nAChR), který přenáší signál mezi motorickým nervem a svalovým vláknem, je aktivovaný nikotinem.

nAChR jsou spřaženy s iontovými kanály buněčné membrány, fungují tedy jako ligandem řízené a řadíme je k ionotropním receptorům. Jejich specifita tkví v ovlivnění toku iontů (zejména kationty Na^+ a K^+) skrz kanály, kdy po navázání ACh je receptor aktivován, dochází ke změně konformace, kanál se otevře a následuje depolarizace postsynaptické membrány a proudění iontů po koncentračním gradientu. Všechny nAChR mají pentamerní strukturu a mají uplatnění zejména v rychlé sympatické transmissi. (Bolis, 2005)



Obr. 2 : Struktura nikotinového receptoru

Dostupné z: <http://docplayer.cz/40728872-Monitorovani-leku-rndr-bohuslava-trnkova-ukbld-1-lf-uk-ls-1.html>

Rozlišují se jednotlivé subtypy nAChR receptoru – nAChR neuronální (N_N), umístěný ve vegetativních gangliích a sekrečních vláknech dřeně nadledvin a dále nAChR muskulární (N_M), ten se nachází na neuromuskulárních spojeních na nervosvalové ploténce. (viz. Tab. 1)

Oba mají pentamerní strukturu, avšak jednotlivé podjednotky se liší – u N_N se jedná o $(\alpha 3)_2$ a $(\beta 4)_3$ a u N_M o $(\alpha 1)_2$, $\beta 1$, γ a δ . (Finkel, 2009; Soukup et al., 2010)

Tab. 1 Přehled nikotinových účinků

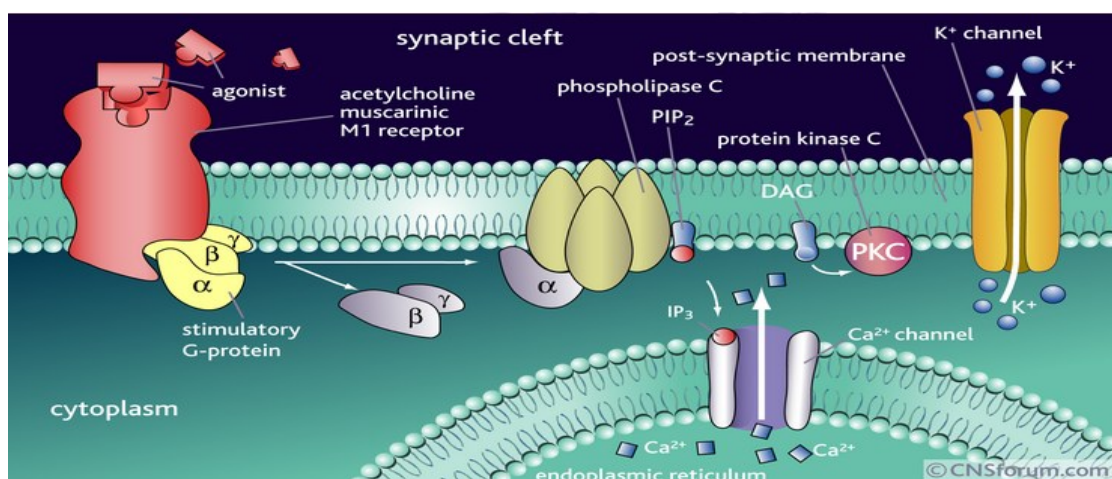
Typ receptoru a lokalizace	Efekt
N_N – neuronální (autonomní ganglia, CNS, dřeň nadledvin)	aktivace, přenos vzruchu
N_M – muskulární	Depolarizace postsynaptické membrány → svalová kontrakce

mAChR jsou spřaženy s G-proteinem, aktivace nebo inhibice G-proteinu moduluje aktivitu enzymatických systémů přes systém druhých posílů. mAChR existuje 5 subtypů, které se liší v umístění a také v dějích, které můžeme očekávat po stimulaci receptoru. M_1 , M_3 , M_5 jsou zodpovědné za aktivaci G_q receptoru, který aktivuje fosfolipasu C, dochází ke štěpení membránového fosfolipidu na fosfatidylinositol 4,5 -bisfosfát (PIP2) a vzniku diacylglycerolu (DAG) a inositoltrifosfátu (IP3). IP3 mobilizuje vápenaté ionty z endoplazmatického retikula (ER) a DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC) a následuje dále fosforylace intracelulárních proteinů. Kdežto M_2 a M_4 jsou spřaženy s G_i proteinem, což má za následek pokles cAMP vedoucí k otevření K^+ kanálů, efluxu K^+ a inhibici. (viz Tab. 2) Fungují jako autoreceptory (tlumí vyplavování ACh na synapsi) v kůře a hipokampu. (Lincová, 2002)

Tab. 2 Lokalizace a účinek jednotlivých subtypů M receptorů

Receptor	Lokalizace	Děje aktivované stimulací receptoru	Efekt
M₁- tzv.neuronální	Nervy, parietální buňky žaludku	↑IP ₃ , kaskáda DAG	Skrz G _q protein ↓permeabilitu pro K ⁺ - depolarizace - ↓jejich denzity - demence
M₂- tzv.kardiální	Srdce, nervy, hladké svaly	↓tvorby cAMP	Skrz G _i protein infix K ⁺ - hyperpolarizace - ↓srdeční frekvence, síly stahu a vedení
M₃	Exokrinní žlázy, hladké svaly	↑IP ₃ , kaskáda DAG	↑intracel.Ca ⁺ - bronchokonstrikce, ↑sekrece žláz a motilita, mióza, ↓nitroočního tlaku, hypotenze – vyplavení NO
M₄[*]	CNS – role v dopam.transmisi	↓tvorby cAMP	Funkce zatím není přesně známa
M₅[*]	CNS?	↑IP ₃ , kaskáda DAG	

Převzato a upraveno z: http://www.cnsonline.cz/?page_id=1456



Obr. 2 : Děje způsobené aktivací M receptoru

Převzato z:

<http://www.usdbiology.com/cliff/Courses/Behavioral%20Neuroscience/Transmitters/transmitterfigs/transmitters.html>

1.2 Cholinesterasy

Cholinesterasy jsou enzymy, které patří do skupiny tzv. serinových hydrolas, které hydrolyzují cholinové estery. U obratlovců rozlišujeme dva typy cholinesteras a to AChE a butyrylcholinesterasu (BChE). Tyto dva typy jsou rozlišeny na základě historického dělení podle substrátové specifity. (Lincová a Farhali, 2007)

AChE se vyskytuje převážně ve svalcích, mozku, membránách erytrocytů, zatímco BChE má vysokou afinitu v játrech, srdci, plicích, střevě, ledvinách a širší substrátovou specifitu. U některých druhů jako člověk, kůň nebo myši, BChE vykazuje vyšší účinnost v plazmě, avšak u krys má vyšší účinnost v plazmě AChE. BChE je syntetizována v játrech a odtud sekretována do plasmu. (Cokugras, 2003)

1.2.1 Acetylcholinesterasa

ACh uvolněný do synaptické štěrbině je třeba nějakým způsobem odbourat, jinak by se hromadil v synaptické štěrbině a udržoval svalový tonus dlouho poté, co byl vydán signál ke stimulaci. Tomu je zabraňováno díky enzymu zvanému acetylcholinesterasa (AChE), která hydrolyticky rozkládá ACh na cholin a acetát, přitom cholin se recykluje zpět do nervových zakončení, pomocí vysokoafinitního přenosového systému závislého na Na^+ , kde se z něj syntetizuje nová molekula ACh. Dle mezinárodní biochemické unie (IUB) spadá AChE do třídy EC 3.1.1.7 do skupiny serinových hydrolas. (Wiesner J. et al., 2007) AChE jeví vysokou katalytickou aktivitu, je uváděno, že každá molekula AChE degraduje až $10^5 - 10^6$ molekul ACh. Maximální rychlost hydrolyzy je při koncentraci ACh $2,5-3 \times 10^{-3}\text{M}$. Optimální rychlost nezávisí na čistotě enzymu, ale na pH a zdroji enzymu. (Radic a Taylor, 2006)

Nachází se převážně v nervosvalových spojeních, cholinergních synapsích v CNS, kde ukončuje cholinergní přenos, a také na membráně červených krvinek, kde tvoří antigen skupiny Yt (také známý jako Cartwright). Tento antigen determinuje typ krevní skupiny u člověka. Systém Yt má dvě alely, YT (a) a Yt (b). Protilátky proti systému Yt mohou vést k transfuzní reakci, jako je hemolytická anémie. Existuje v několika molekulárních formách, liší se oligomerní strukturou a tím, jak se váže na buněčný povrch.

Molekula AChE má elipsovitý tvar. Monomer enzymu AChE je bílkovina skládající se z 537 aminokyselin (AK). Její struktura je tvořena 12 centrálně umístěnými β -skládanými listy, které obklopuje 14 α -helixů. (Čolović, 2013)

Každý monomer obsahuje jedno katalytické centrum, které je složeno ze dvou částí - esteratické podjednotky obsahující katalytickou triádu a anionické podjednotky, sloužící k vytvoření vazby s kvartérním dusíkem ACh. Esteratická podjednotka obsahuje katalytický aparát enzymu, nazývaný tzv. katalytická triáda aminokyselin (CAS) Ser 200, His 440 a Glu 327. Anionická podjednotka je složena z aminokyselin Ser 84, Phe 330 a Phe 331. (Sussman et al., 1991)

AChE existuje v několika molekulárních formách, které lze rozdělit na globulární (G) a asymetrické (A). G formy existují v solubilní a membránově vázané formě a obsahují buď jednu (G1), dvě (G2) nebo čtyři (G4) identické katalytické podjednotky. Tyto jednotlivé subjednotky mají hmotnost 77 kDa a tvoří dimery, spojené disulfidickými můstky. Membránově vázané formy obsahují nekatalytickou subjednotku, tzv. kotvu, jejíž funkcí je fixovat enzym v membráně. Asymetrické formy se skládají z jednoho (A4), dvou (A8) nebo tří (A12) tetramerů, které jsou navzájem spojené díky kolagenu podobných, peptidických řetězců.

G1 a G4 forma AChE se vyskytuje v lidském mozku, jejich poměr se v mozku v různých částech liší. V erytrocytech převládá forma G2, kdežto v lidském mozku jsou zastoupeny z 80 % G4 forma AChE. V mozkomíšním moku a plazmě byly identifikovány formy G4 AChE. Rozdíly v zastoupení molekulárních forem AChE jsou patrné i na synapsích. G4 formy jsou přítomny v nesynaptických částech, zatímco G1 formy v postsynaptických. Všechny tyto formy AChE mají stejnou katalytickou aktivitu. (Patočka et al., 2001)

V organismu převládá přítomnost AChE ve formě tetramerů. Vznik AChE_R (readthrough) podjednotky je podmíněn při tvorbě katalytické domény v důsledku nedostatku posttranslačních modifikací. Tyto jednotky jsou rozpustné a monomerické. Přítomnost AChE_R byla prokázána v embryonálních tkáních a buněčných kulturách, též nalezena v myších, ale nikoli v lidských erythrocytech. Její tvorba může být navozena stresem. AChE_H (hydrofobní) podjednotky jsou tvořeny glykofosfatidylinositolem (GPI) kotvené dimery. V organismu je AChE_H tvořena hematopoetickým systémem, kde se pravděpodobně podílí na eliminaci ACh v krevním řečišti. AChE_T (tailed – ocasatá) tvoří celou řadu oligomerů – mono, di, tetra včetně heterotetramerů s kolagenem Q, GPI - kotvené tetramery a tetramery kotvené ke tkáni bohaté na prolin. AChE_T se vyskytuje v tkáních všech obratlovců a jedná se o nejhojněji zastoupenou formu v organismu. V jedových žlázách některých hadů rodu *Bungarus* a *Naja* byla identifikována forma AChE_S (soluble - rozpustná). (Holas, 2012)

V současné době je aktivita cholinesteras vyjadřována v kataltech na litr (kat/l), což odpovídá přeměně jednoho molu substrátu za sekundu na litr, např. séra či plazmy. (Bajgar, 1972)

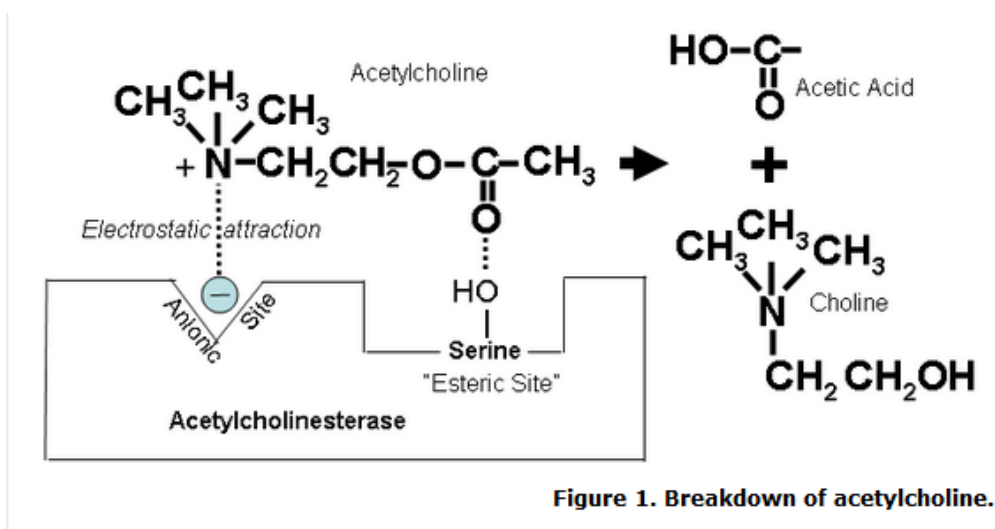


Figure 1. Breakdown of acetylcholine.

Obr. 3: Hydrolýza AChE enzymem AChE

Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=5>

1.2.2 Butyrylcholinesterasa

Lidská BChE má uplatnění jako bioscavanger, což je molekula schopná neutralizovat neurotoxické organofosfátové sloučeniny. Jedna molekula enzymu je schopna navázat jednu molekulu organofosfátu. Její význam však není úplně jasně definovaný jako v případě AChE. V minulosti se nazývala plazmatická cholinesterasa díky tomu, že AChE se nachází na povrchu erytrocytů a po centrifugaci krve zůstává v plazmě jen BChE. (Radic a Taylor, 2006)

Substráty BChE jsou estery jako produkty metabolismu, lépe hydrolyzuje butyrylcholin či benzoylcholin. Obecným faktem je, že BChE váže především objemné ligandy. (Soukup, 2010). Mezi tyto exogenní substráty lze zařadit heroin, kokain, tetrakain, aspirin apod. BChE také hydrolyzuje ACh, avšak výrazně pomaleji. (Gannong, 1995)

Na molekulární úrovni mají AChE a BChE společnou sekvenční homologii aminokyselin z 65 % a jsou kódovány různými geny na lidských chromozomech – 7 pro AChE a 3 pro BChE. O vzniku molekulárních forem AChE a BChE rozhoduje vždy jen jediný gen, v důležitosti alternativního sestřihu kódovací oblasti původního transkriptu. To má za následek sérii AChE a BChE, které mají podobné katalytické vlastnosti, ale odlišnou buněčnou a mimobuněčnou distribuci a nekatalytické aktivity. Strukturní vlastnosti obou cholinesteras určují rozdíly v jejich substrátové specifitě. (Brunovský, 2007)

2. Inhibitory AChE

Inhibitory AChE blokují funkci enzymu zodpovědného za ACh rozklad, což vede k akumulaci acetylcholinu v nervových synapsích. Zvýšené množství ACh ve štěrbině způsobuje nervosvalovou paralýzu (trvalý svalový tonus) v celém těle. Staženo je i dýchací svalstvo a s tím spojené riziko smrti z udušení.

Rozlišují se inhibitory neacylující a acylující. Neacylující inhibitory vyvolávají reverzibilní a krátkodobou blokádu uvedeného enzymu. Kompetitivní inhibicí brání, aby se ACh navázal na enzym, avšak nemají schopnost esterifikace hydroxyly aminokyseliny (AK) serinu. Do této skupiny je řazen antagonist kurareformních myorelaxancií edrofonium, který má uplatnění v diagnostice Myasthenia gravis. U zástupců acylujících inhibitorů probíhá podobná reakce jako ACh s AChE. V případě karbamátových inhibitorů vzniká karbamoylovaná AChE, která v organismu spontánně hydrolyzuje, ale značně pomaleji než AChE acetylovaná. Inhibice navozená těmito inhibitory trvá minuty až hodiny.

Mezi inhibitory karbamátového typu řadíme fyzostigmin, který se používá především v očním lékařství jako miotikum a pro snížení nitroočního tlaku a dále neostigmin, který působí 3-6 hodin či pyridostigmin, který má prolongovaný účinek 6 hodin a minimální vedlejší účinky, oba využívané k terapii myasthenia gravis. (Doležal M. et al., 2011)

S ireverzibilním charakterem blokace se můžeme setkat u OFI, kdy hydroxyl aktivního centra AChE je blokován zbytkem kyseliny fosforečné či fosfonové. Takový komplex inhibitoru vázaného na enzymu hydrolyzuje v organismu velmi pomalu v řádech stovek hodin a navíc podléhá tzv. stárnutí (dealkylace), což je chemická reakce, při které je inhibovaná AChE změněna tak, že je účinku reaktivátorů nepřístupná a je v tzv. nereaktivovatelné formě. Inhibice má tedy ireverzibilní charakter.

Celkový účinek inhibitorů AChE závisí na fyzikálně-chemických, chemických vlastnostech a taktéž na jejich distribuci v organismu. Inhibitory s karbamátovou funkční skupinou obsahují terciární dusík, dobře se vstřebávají, pronikají HEB a mají periferní i centrálně cholinergní účinky. Inhibitory s kvartérním dusíkem působí především na periférii, tedy špatně přestupují přes HEB. Navíc mají přímé nikotinové účinky na nervosvalovou ploténku a jsou vhodné při léčbě MG jak bylo uvedeno u neacylujícího inhibitoru edrofontia. (Patočka et al., 2004)

K přírodním inhibitorům AChE je řazen galantamin a další látky rostlin z čeledi *Amarillydaceae*. Tento alkaloid byl jednou z prvních látek používaných k terapii myasthenia gravis a paralytické poliomyelitidy. Výhoda galantaminu v porovnání s ostatními inhibitory AChE spočívá v jeho schopnosti alostericky modulovat nAChR, což zároveň zvyšuje produkci ACh. Galantamin je již delší dobu používán k terapii Alzheimerovy choroby. V současné době je ve vědeckých studiích používán jako standard inhibiční aktivity AChE a ostatní potenciální léčiva jsou s ním srovnávána. (Martin et al., 2011)

2.1 Nervově paralytické látky

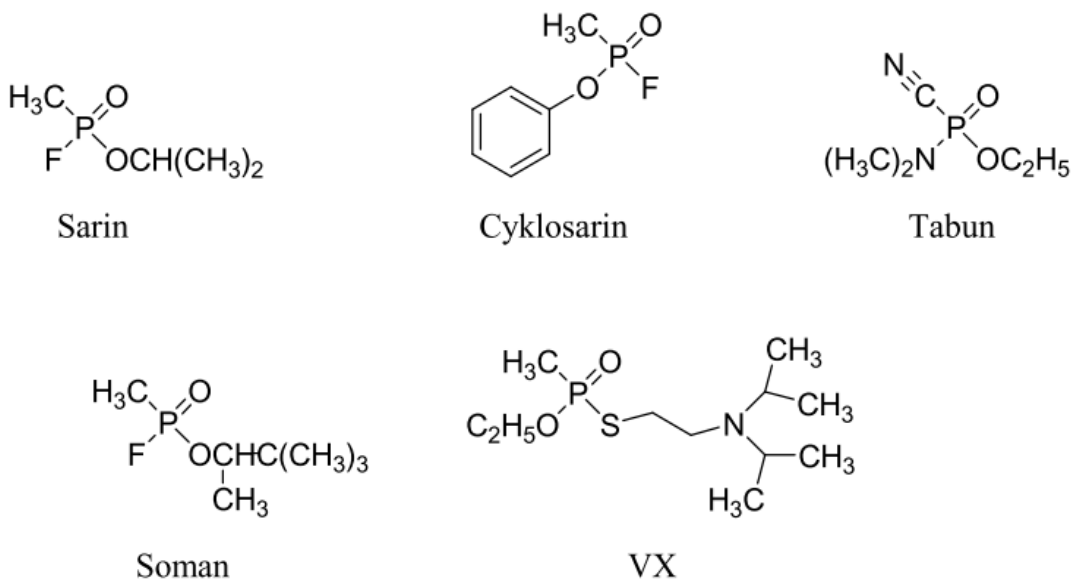
Nervově paralytické látky (NPL) patří mezi organické sloučeniny fosforu a jsou řazeny k nejvýznamnější a nejnebezpečnější skupině bojově chemických látek díky vysoké toxicitě. Jsou charakterizovány rychlým nástupem účinku a pronikají do organismu všemi vstupními bariérami. Byly vyvinuté těsně před druhou světovou válkou (tabun – r. 1936), během ní (sarin - r. 1943 a soman – r. 1945) či až po druhé světové válce (VX látky – 60. léta 20. století). Jedná se o látky poměrně „staré“, jejichž používání je zakázáno Úmluvou o zákazu chemických zbraní a jejich vysoká toxicita a snadná syntéza z nich činí lehce zneužitelné zbraně hromadného ničení a teroristických útoků, což se prokázalo již v historii, kdy byly použity ve vojenském konfliktu v průběhu Iránsko-Irácké války. V roce 1988 byly použity proti kurdskému obyvatelstvu ve městě Halajbla, režimem Saddáma Husajna. A v posledních letech se jednalo o jejich zneužití náboženskou sektou Aum Shinrikyo při teroristické útoku na japonské metro v Tokiu v roce 1995, které si vyžádalo 12 obětí a 5500 zraněných či rok před tím v Matsumotu a nebo v roce 2013 v Sýrii. (Masuda et al., 1995)

Rozdělují se na 2 větší skupiny, obecně označovány jako G látky a V látky. Zástupci ze skupiny G látek, mezi něž patří tabun (GA – O-ethylmethylamidokyanofosfát), sarin (GB – O-isopropylmethylfluorofosfát) a soman (GD – O-pinakolylmethylfluorofosfonát), jsou bezbarvé kapaliny, bez výraznějšího zápachu, relativně rozpustné ve vodě a dobře rozpustné v organických rozpouštědlech.

Dále jsou vysoce těkavé, tudíž nejčastější bránou vstupu těchto látek do organismu jsou dýchací cesty. V terénu vydrží 12-24 hodin bez ztráty toxicity. Toxicita NPL je tedy závislá na přírodních cestách noxy do organismu, rychlosti u organismu, prostředí a na dalších faktorech jako je vítr, déšť a teplota. (Patočka et al., 2004)

V látky jsou toxicitější než G látky, zvláště při intoxikaci přes kůži, protože jsou špatně rozpustné ve vodě, zato velmi dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a tucích. Typická je pro ně nízká těkavost, takže vydrží ve vodě a v terénu velmi dlouhou dobu (týdny až měsíce). Největšího vojenského významu dosáhla látka VX (O-ethyl-S-(2-diisopropyl-aminoethyl)-methylthiofosfonát).

Základním mechanismem účinku NPL je zásah do cholinergního nervového systému ireverzibilní cestou inhibice AChE. Ireverzibilní inhibice AChE cestou acylace esteratického místa aktivního centra enzymu ($IC_{50} = 10^{-8}$ až 10^{-12} M) s následnou kumulací neuromediátoru acetylcholinu na cholinergních synapsích, způsobující narušení cholinergního přenosu nervového vzruchu (endogenní intoxikace acetylcholinem). (obr. 5)



Obr. 4 : Chemické struktury nejznámějších nervově paralytických látek.

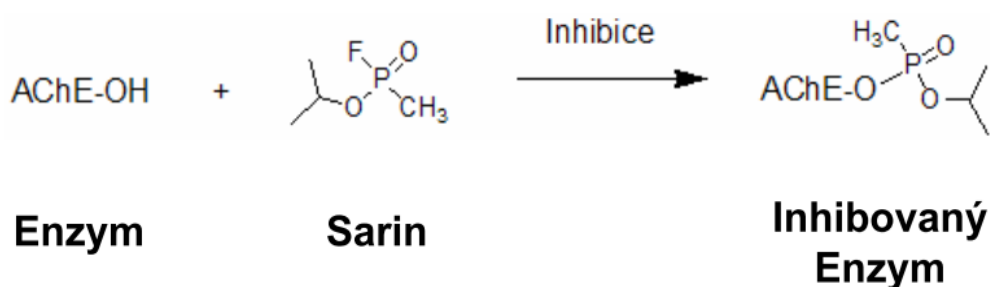
Tab. 3 Toxicita NPL

	Toxicita a průnik do těla	LC₅₀	Střední smrtelná dávka pro zamoření nechráněné kůže
G-látky	Nejzávažnější cestou jsou vzhledem k vysoké těkavosti dýchací cesty	0,03-0,08 g.min ⁻¹ .m ⁻³	0,7-7 mg.kg ⁻¹
V-látky	Jsou toxičtější než G-látky, zvláště při otravě přes kůži	0,015-0,040 g.min ⁻¹ .m ⁻³	0,07 mg.kg ⁻¹
Látka se střední těkavostí	Nebezpečná z hlediska všech cest průniku do organismu	-	cca 1,36 mg.kg ⁻¹

LC₅₀ – střední letální koncentrace v ovzduší vedoucí po 1 minutové expozici ke smrti 50% exponovaných nechráněných osob

Vztah mezi strukturou a účinkem ve skupině OFI lze stručně shrnout takto:

- Estery fosfonové kyselin bývají toxičtější než analogické estery kyseliny fosforečné
- Sloučeniny s jednou vazbou P-N bývají toxičtější než sloučeniny se dvěma vazbami tohoto typu
- Toxicita klesá v řadě F, I, CN
- Oxosloučeniny jsou toxičtější než jejich thioanalogy



Obr. 5 : Proces sarinem inhibované AChE

2.1.1 Farmakokinetika NPL

Po vstupu NPL do organismu probíhají 4 hlavní fáze jejich účinku a to resorpce, transport, metabolizace a vlastní toxický efekt. Vlastní toxický efekt tvoří pouze část podané dávky, zbytek představují ztráty, které vznikají různými způsoby. V krevním oběhu reagují NPL s cholinesterasami a jinými dalšími enzymy. Jedná se především o BChE, karboxylesterasy a fosforylfosfatasy v plazmě. Vazba NPL na esterasy nevyvolává žádný klinický příznak intoxikace, ba právě naopak, slouží jako vychytávači (scavengery) NPL. Esterasy na sebe vážou část dávky a vyřadí ji z vlastního toxického účinku. Takto vznikají již zmiňované ztráty podané dávky a uvádí se, že ztráty mohou dosáhnout podle druhu NPL až 99 %. Předpokládá se tedy, že pouze 1-3 % z celkové dávky se dostane na místo toxického účinku, zbytek je vyváznut a detoxikován. (Patočka et al., 2004)

Metabolizace představuje detoxikační reakce, však u některých organofosforových insekticidů bylo zaznamenáno, že vlastní látka se oxidovala, vzniklý derivát byl toxičtější a znovu byl vyplaven do krve a působil dále v organismu (hlavně u organofosforových insekticidů). Zejména pak soman může tvořit depa v tukové tkáni a z ní je postupně vyplavován.

Efekt inhibice AChE v místě toxického působení NPL (centrální i periferní nervový systém, nervosvalová ploténka) se projeví nahromaděním ACh na receptorech s následným dlouhodobým drážděním cholinergních receptorů, který se klinicky projeví ihned po zasažení. Dále byly pozorovány i účinky nespecifické neboli necholinergní, které se manifestují později a řadíme k nim obecnou stresogenní reakci, zásah do metabolismu nukleových kyselin (NK) a bílkovin vedoucí až k mutagennímu efektu, zásah do imunity a hepatotoxický efekt. Nespecifické účinky NPL mají za následek i významné poškození nervové tkáně, patřící k závažným důsledkům akutní intoxikace NPL. Podle posledních výzkumů příčina tkví v nadměrné stimulaci glutamatergických receptorů N-methyl-D-asparagové kyseliny (NMDA) a následně nadměrnému vyplavení glutamátu. Aktivované NMDA receptory akumulují vápník uvnitř neuronů a dochází k neuronální smrti a s tím související dlouhodobé neurologické následky patrné i několik let po expozici NPL.

3. Antidota AChE

AChE je působením inhibitorů vyřazená z funkce a spontánní znovuoobnovení aktivity (reaktivace) probíhá velmi pomalu. Aktivita AChE se obnoví až po syntéze enzymu de novo. Plná regenerace enzymu v mozku trvá přibližně 50 dnů. Jelikož bezjaderné erytrocyty nejsou schopny syntézy bílkovin, jejich enzymová aktivita se zotaví až za 100 dnů, tedy po náhradě otrávených buněk novými erytrocyty. Nebezpečné příznaky otravy vymizí však v ten moment, kdy se obnoví pouhý zlomek normální enzymové aktivity. (Lüllman et al., 2004)

Vzhledem k vysoké toxicitě OFI a jejich rychlému nástupu účinku, musí být terapie dostatečně rychlá, radikální a komplexní. (Vopršalová, 1996)

3.1 Profylaktická léčba

K profylaxi otrav se přistupuje v případech, kdy se předpokládá zvýšené riziko kontaktu s těmito sloučeninami (např. ve vojenství, při pohybu vojáků v kontaminovaném terénu či při likvidaci živelných katastrof). Látkami volby při profylaxi jsou reverzibilní inhibitory AChE. Nejčastěji užíván karbamát pyridostigmin jako současná profylaxe u většiny armád NATO. Tyto reverzibilní inhibitory jsou schopně dočasně ochránit molekulu AChE před ireverzibilní inhibicí. V praxi se často používají inhibitory v kombinaci s anticholinergiky, jejichž funkcí je ochrana pacienta před nežádoucími účinky inhibitoru.

Prostředky farmakologické profylaxe otrav NPL – AČR:

- AČR – PANPAL (české originální směsné profylaktické antidotum pro zvýšení odolnosti živé síly vůči účinkům NPL a zvýšení účinnosti následné antidotní terapie otravy NPL)

Složení – pyridostigmin bromid (35 mg tableta) a dvě anticholinergní látky (benaktyzin chlorid -8 mg a trihexyfenidyl chlorid - 6 mg v 1 tabletě).

- TRANSANT - originální české transdermální profylaktické antidotum

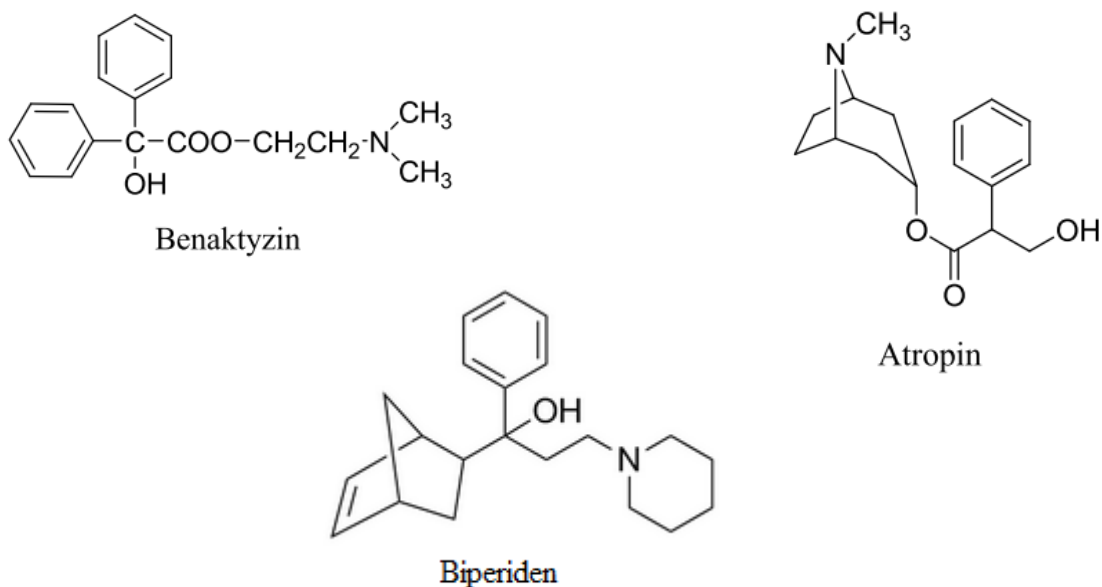
Složení: dvě adhezivní náplasti (70 cm²), malá lahvička s lyofilizovanou HI-6, ampulka s pufrem, jehla s injekční stříkačkou

- Armády NATO – pouze pyridostigmin bromid (NAPS) – 30 mg pyridostigminu v 1 tabletě

3.2 Léčba po zasažení NPL

Základní terapie otrav při intoxikaci NPL se skládá ze tří základních složek: funkčního antidota s anticholerním účinkem, kauzálního antidota (reaktivátoru AChE) a terapie bývá ještě doplněna o antikonvulzivum. Mezi konvulzivy dominuje použití diazepamů v dávce 10 mg i.v. a dále také alprazolamu či clonazepamů.

Anticholinergika (funkční antidota) zabraňují navázání nahromaděného ACh na cholinerní receptory. Jako lék volby v této skupině je na celém světě řazen atropin. Atropin antagonizuje účinek nahromaděného ACh, především na periferních mAChR. Centrální příznaky intoxikace ovlivňuje méně, jelikož obtížně prochází přes HEB. Podává se i.m. nebo i.v. v dávce 2-4 mg opakovaně v 10-30 minutových intervalech. Jako výhodné se jeví i podávání atropinu v infuzi. (Patočka et al., 2004) Atropin se podává do té doby, než se objeví první příznaky atropinizace a to jsou: mydriáza, zčervenání kůže, suchost sliznic, tachykardie. V případě těžkých intoxikací je možné doplnit atropinizaci podáváním anticholinergik s převládajícím centrálním účinkem. Na základě experimentálních výsledků se mezi vhodná anticholinergika s centrálním působením řadí biperiden, skopolamin a benactyzin, který je v AČR zaveden jako druhé anticholinergikum po atropinu. benactyzin, biperiden a skopolamin.



Obr. 6: Chemická struktura vybraných anticholinergik.

Prostředky AČR proti NPL při zasažení:

- První pomoc:

- Combo-Pen (obidoxim 220 mg, atropin 2 mg) a Diazepam (10 mg)
- Budoucnost: tříkomorový autoinjektor s lyofilizátem HI-6 750 mg, roztok atropinu 2 mg a diazepamu 10 mg

- První lékařská pomoc:

- Chonol I (atropin, 4 mg v 1 ampuli)
- Chonol II (benaktyzin, 10 mg v 1 ampuli)
- Renol (1g methoxim chloridu)
- Antiva (0,8 g HI-6)

3.2.1 Reaktivátory

Reaktivaci inhibované AChE je možno urychlit látkami, nazývanými reaktivátory (kauzální antidota). Jejich úkolem je vyvázání inhibitoru z aktivního místa AChE a tím dojde k zabránění vzniku kovalentní vazby. Účinek však závisí na procesu stárnutí (dealkylace), kdy je inhibovaná AChE účinku reaktivátorů nepřístupná. Rychlost stárnutí inhibované AChE závisí na době kontaktu enzymu s NPL a na chemické struktuře inhibitoru. Za nejhůře léčitelnou otravu se řadí intoxikace somanem, jelikož dealkylace komplexu AChE-inhibitor probíhá velmi rychle, zatímco nejpomalejší dealkylace je charakteristická pro účinek látky VX, poločas dealkylace je řádově dny, patrné z Obr. 7. (Patočka et al., 2004)

Inhibitor AChE	T _{1/2}
soman	2-10 min
sarin	3-10 h
tabun	13 h
cyklosarin	40 h

Obr. 7: Poločasy stárnutí jednotlivých NPL

Mezi nejznámější zástupce v praxi užívané patří:

- Pralidoxim – 2-PAM; 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium chlorid)
- Obidoxim – Toxogonin ®; 1,3,-bis-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropan dichlorid
- Trimedoxim – 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)propan dibromid
- HI-6 - 1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxapropan dichlorid

Žádný z dosud známých reaktivátorů není schopen uspokojivě reaktivovat AChE inhibovanou všemi typy OFI. (Musílek, 2005; Mercey G. et al., 2012)

Reaktivátory jsou taktéž označovány jako oximy, protože obsahují ve své molekule funkční oximovou skupinu ($R-CH=NOH$), která je při fyziologickém pH lidského těla částečně disociována na nukleofilní oximátový anion. (Kuča, 2003) Praktický význam mají především oximy s kvartérním dusíkem ve své molekule, které mohou reagovat jak s esteratickým, tak anionickým místem AChE. (Doležal et al., 2011)

Reaktivátory jsou podávány většinou ve formě solí (bromidy, chloridy, methylsulfonáty atd.) Typický způsob podání je intramuskulárním bolusem a následné pokračování v kontinuální infuzi. Terapeutická dávka je účinná, pokud je aplikovaná v množství pohybující se v mg/kg zasaženého jedince (pralidoxim 15-30 mg/kg, max 12g/24 hod, obidoxim 3 mg/kg, max 750 mg/24 hod. (Ševela, 2002)

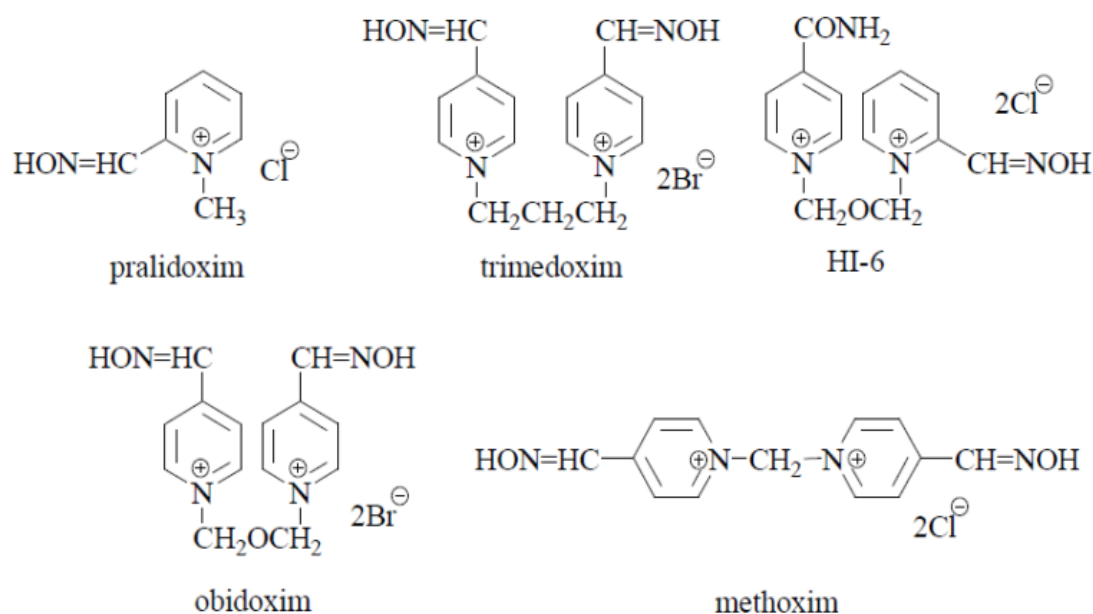
Podle počtu kvartérních dusíků v molekule, které zajišťují afinitu k enzymu, rozlišujeme reaktivátory na monokvartérní (monopyridinové) a biskvartérní (bispyridinové). Pralidoxim je zástupcem monokvartérních oximů a reaktivuje částečně i AChE v mozku. I přesto, že z celkové podané dávky pouze asi 10 % proniká skrz HEB. Biskvartérní pyridinaldoximy, kde se řadí obidoxim, pronikají do CNS ještě hůř než 2-PAM, reaktivují AChE zejména na nervosvalové ploténce. Obecně lze říci, že reaktivační schopnost výše uvedených oximů je poměrně omezená z důvodu rychlosti stárnutí inhibovaného enzymu. (Patočka et al., 2004)

Důležitou roli v účinnosti a rychlosti reaktivace hraje struktura daného oximu, kdy poloha a počet oximových skupin navázaných na pyridinových jádrech výrazně ovlivňuje vznik kovalentní vazby.

Později byl pro AČR byl vyvinut oxim s podobnou strukturou pralidoximu methoxim (N, N'-trimethylen bis-(4pyridiniumaldoxim/dichlorid)), který se jevil z řady reaktivátorů AChE jako účinnější. Poměrně nízká reaktivační schopnost výše uvedených reaktivátorů vede k pátrání po nových, účinnějších oximech, z nichž zástupce biskvartérních pyridinaldoximů označovaný jako HI-6 se dočkal zavedení po léčebné praxe. AČR má tedy k dispozici lékovou formu oximu HI-6 připravenou k použití při zasažení NPL, jako jedna z mála armád na světě v dávce 0,8-1,0 mg při intramuskulárním i intravenózním podání. (Patočka J. et al., 2004). Oxim HI-6 neboli asoxim, je považován za optimální lék volby v případě zasažení G látkami.

Všechny současně dostupné reaktivátory jsou řazeny mezi kvartérní oximy. V minulosti byl výzkum zaměřen zejména na syntézu reaktivátorů odvozených od pyridinu a byla vyhodnocena jejich reaktivační účinnost proti OPI. (Musilek K. et al., 2011) Zjistilo se, že prostup těchto reaktivátorů skrz HEB je značně omezený a tudíž nejsou schopny snadno a dostatečně reaktivovat AChE inhibovanou OPI v mozku. Zatímco nervově paralytické látky mohou snadno difundovat skrz HEB a rychle inhibovat centrální AChE.

V posledních letech probíhá výzkum zabývající se vlivem struktury oximu na reaktivační proces na Katedře toxikologie FVZ v HK a dalších spolupracujících pracovištích, kde byla také syntetizována řada nových struktur reaktivátorů jako potencionální řešení v hledání nových a univerzálnějších. Označují se jako K-substance a v současné době probíhá jejich in vitro a in vivo testování.



Obr. 8: Struktura vybraných oximů

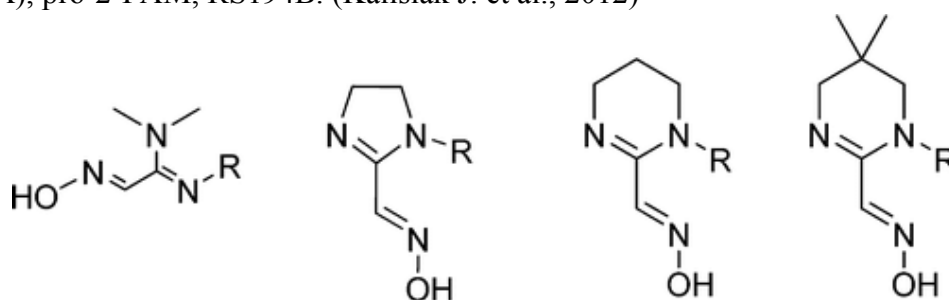
K překonání výše zmíněných problémů byla navržena a následně syntetizována řada reaktivátorů s nekvarterní strukturou (nekvarterní reaktivátory). Zvýšením lipofility bylo docíleno, že mohou penetrovat skrz HEB, čímž je zaručena vyšší terapeutická koncentrace v mozku v porovnání se standartní používanou terapií. Svými zvýhodněnými vlastnosti ukazují značnou převahu nad kvartérním a často používaným reaktivátorem 2-PAM jako antidota při centrální otravě. Avšak z praktického hlediska jsou doprovázeny i řadou nevýhod jak z farmakologického, tak toxikologického hlediska. Jejich vyšší lipofilita vede ke snížené rozpustnosti v hydrofilním médiu a tedy základní fakt, že nekvarterní reaktivátory prostupují HEB je ovlivněn mnoha strukturálními rysy, které tuto vlastnost ovlivňují, například velikost molekuly nebo polarita funkčních skupin. Také parenterální aplikace, klíčová cesta podání z důvodu rychlého nástupu otravy, je nemožná či přinejmenším problematická.

Lipofilní charakter molekul může měnit farmakokinetický profil a změny se mohou projevit v rozdílné absorpci, prodlouženému kontaktu v organismu, zvýšené interakci s plazmatickými bílkovinami a rozdílné distribuci. Mimoto mají nevýhody i z hlediska toxikologického. Je brána skutečnost, že všechny dostupné inhibitory AChE jsou známy jako slabé inhibitory. (Kovarík Z. et al., 2008)

Nicméně pokud se v mozku vyskytne vysoká koncentrace reaktivátorů, lze očekávat toxický efekt přisuzovaný reaktivátorům AChE. V neposlední řadě produkují toxické metabolity na rozdíl od kvartérních oximů, které toxické metabolity nemají vzhledem k jejich hydrofilní povaze.

Jednou skupinou z řad nekvartérních reaktivátorů syntetizovanou in vitro jsou amidin-oximové reaktivátory, které ve své molekule obsahují jak amidinovou skupinu, tak oximovou, neobsahují tedy kvartérní dusík. (Obr. 13) Ve srovnání s neúčinnějším reaktivátorem 2-PAM se ukázal jako nejslibnější zástupce této skupiny cyklický amidin oxim, který měl srovnatelné či prokazatelně vyšší antidotní schopnosti OPI inhibované AChE. Podle dostupných zdrojů se jedná o první látku z řad nekvartérních oximů, která má srovnatelný účinek s 2-PAM na sarinem blokovanou AChE. (Kalisiak J. et al., 2012)

Nedávno bylo zjištěno, že i skupina ortho-hydroxybenzaldoximů ukazuje schopnost účinně a selektivně štěpit P-S vazbu v OFI a tím vyvazovat inhibovanou AChE. Další výsledky výzkumu poukazují na potenciální zástupce s vylepšenými antidotními vlastnostmi, kam se řadí α keto thiohydroximáty, monoisonitrosoaceton (MINA), pro-2-PAM, RS194B. (Kalisiak J. et al., 2012)



Amidine-Oxime Reactivators

Obr. 9: Struktura nekvartérních amidin-oximových reaktivátorů

Převzato z : Kalisiak J. et al. (2012)

Laboratoře v Mississippi State University zaměřily svůj výzkum na vývoj dalších nových struktur oximů, účinných na AChE inhibovanou sarinem a VX, které mají alkylový řetězec s 3 až 5 atomy uhlíku, s různými substitucemi na fenoxyskupině. Hypotézou je, že fenoxyalkylová skupina zvyšuje lipofilitu a má tedy tendenci vyvažovat pozitivní náboj z kvartérního amoniaku, což umožňuje proniknutí do mozku. (Chambers et al., 2016)

4. Cíl

Cílem této diplomové práce bylo stanovit reaktivační účinnost nově nasyntetizovaných kvartérních reaktivátorů (K870 a K869) in vivo a tuto účinnost porovnat s doposud používanými komerčně dostupnými reaktivátory – K160 a HI-6. Byla stanovena aktivita AChE zjištěna při měření v krvi, mozku a bránici potkanů. Testování bylo zaměřeno na AChE inhibovanou sarinem ze skupiny OFI a probíhalo na katedře toxikologie a vojenské farmacie FVZ v Hradci Králové.

Získané výsledky by měly poskytnout informace o tom, zda jsou nově syntetizované reaktivátory účinnější a univerzálnější volbou a případně, jaký vliv na reaktivaci má druh podaného NPL a struktura zkoušeného reaktivátoru.

5. Metodika

5.1 Princip metody

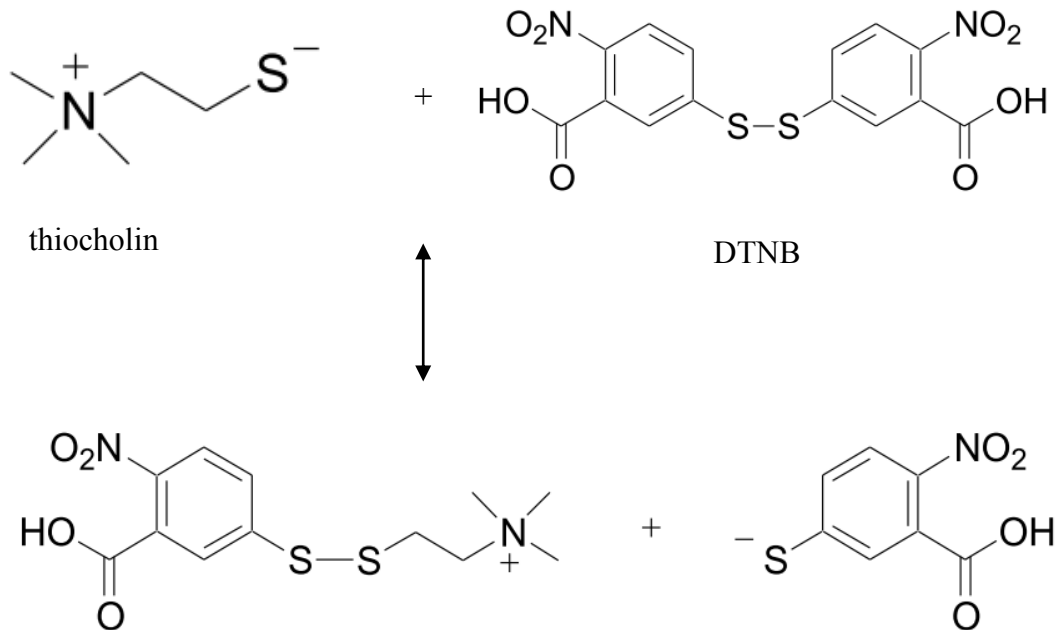
Pro určení účinnosti jednotlivých kvartérních reaktivátorů byla použita standardní Ellmanova metoda. Měření se prováděla na spektrofotometru Helios Alpha při vlnové délce 436 nm, z důvodu spektrálního posunu při reakci s hemoglobinem.

Princip Ellmanovy metody spočívá v reakci 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoové kyseliny) (DTNB) s acetylthiocholinem (ATCh) za vzniku produktu, který je nejlépe detekovatelný při vlnové délce 412 nm. Průběh celé reakce probíhá v několika krocích. Prvně dochází k rozštěpení substrátu ATCh jodidu na kyselinu octovou a thiocholin. Ten dále reaguje s DTNB, dochází k rozštěpení disulfidického můstku a sám se naváže na vzniklou thiolovou skupinu jedné části DTNB. V druhé části molekuly DTNB kyseliny 5-merkapto-2-nitrobenzoové dochází ke konjugaci dvojných vazeb za vzniku stanovovaného produktu – 5-merkapto-2-nitrobenzenového aniontu. (TNB⁻)

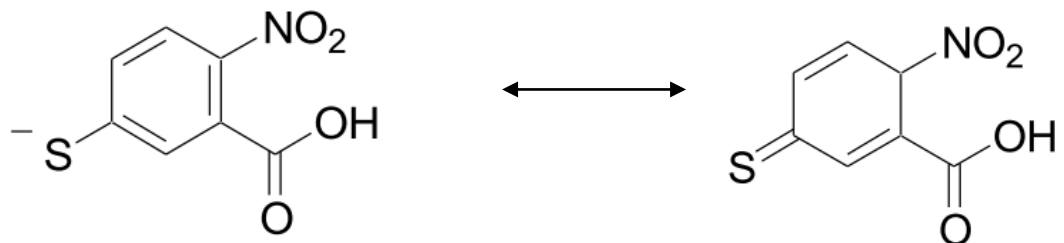
1. Rozštěpení ATCh AChE za vzniku příslušné kyseliny a thiocholinu



2. Rozštěpení disulfidických můstků a vazba thiocholinu na DTNB



3. Konjugace dvojných vazeb kyseliny 5-merkpto-2-nitrobenzoové



Ačkoliv je Ellmanova metoda jednoduchá na provedení, poměrně rychlá a levná, její nevýhodou při stanovení aktivit cholinesteras v krvi je interference s hemoglobinem, jehož absorpční maximum je shodné se vznikajícím barevným aniontem. Tuto interferenci jsme se v experimentu snažili omezit přípravou hemolyzátu plné krve, kdy krev byla naředěna v poměru 1:20 a modifikací vlnové délky na hodnotu 436 nm. (Žďárová – Karasová, 2010)

5.2 Chemikálie

Všechny používané chemikálie a standardy byly zakoupeny u firmy Sigma Aldridge (Česká republika).

- Tris pufr 0,1 M; pH 7,6 – obsahuje tris(hydroxymethyl)aminometan o koncentraci 10 mM a EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina) o koncentraci 1 mM. Uchováván v lednici.
- Tris pufr 0,2 M; pH 7,6 – obsahuje tris(hydroxymethyl)aminometan o koncentraci 10 mM a EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina) o koncentraci 2 mM. Uchováván v lednici.
- ATChI – specifický substrát pro stanovení aktivity AChE. Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 0,029 g ATChI v 10 ml destilované vody., výsledná koncentrace je tedy 10 mM. Tento roztok se napipetuje po 1 ml a uchovává se v mrazničce při teplotě -12°C . V době potřeby byl použit rozmražený 1 ml obsah zkumavky a zásobní roztok naředěn s destilovanou vodou v poměru 1:10 (roztok ATChI: destilovaná voda).
- DTNB – zásobní roztok DTNB byl připraven tak, že 0,1 g 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny se rozpustí za stálého míchání v 100,0 ml 0,1 M tris pufru. Koncentrace roztoku používaného k měření je tedy 2,5 mM. Roztok je nestálý na světle, proto je uchováván během pokusu v baňce obalené alobalem a připravován vždy v čase potřeby. Díky slunečním paprskům by mohlo dojít k rozštěpení DTNB a vzniku TNB^- , čímž by se mohla zanechat chyba do dalšího spektrofotometrického stanovení.

- Cystein chlorid – 1ml zásobního roztoku cystein chloridu se používá před začátkem jednotlivých měření ke kalibraci. Zásobní roztok je připraven rozpuštěním 0,03152 g cystein chloridu ve 200 ml destilované vody. Vytvoří se koncentrační řada v závislosti na zvyšující se koncentraci cystein chloridu a je změřena a vyhodnocena koncentrační křivka. Zásobní roztok je rozdělen na dávky 1 ml do mikrozkušavek a je skladován při teplotě -12°C až do doby, kdy je použit ke kalibraci.
- AChE – použitá potkaní AChE z jednotlivých orgánů zvířete - mozku, bránice a krve. Měřila se aktivita roztoku AChE. AChE byla naředěna pufrům v závislosti na hmotnosti jednotlivých vzorků (váha x tris pufr 0,02M). Připravený enzym byl uchováván v mrazáku a při jednotlivých pokusech byl pomalu rozmražen a ihned použit k měření.

5.3 Zvířata

Pokusy probíhaly na samcích potkanů kmene Wistar. Potkani přebývali v klimatizované místnosti, krmeni byli klasickou peletovou dietou a vodou ad libitum.

Zvířata byla rozdělena do 6 skupin po 8 jedincích. Experiment probíhal ve 2 měřeních, při kterých byla testována aktivita AChE v jednotlivých vzorcích potkaní tkáně a to v krvi, mozku a bránici. Celý experiment probíhal pod záštitou Etické komise Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové a personál manipulující s pokusnými zvířaty byl řádně proškolen a získal osvědčení o způsobilosti pracovat s laboratorními zvířaty podle § 17odst. 1 zákona č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

5.4 Kalibrační řada

Před vlastní kalibrací je připravena cysteinová kalibrační řada. Základní roztok cysteinu je ředěn vždy v poměru 1:1 (koncentrovanější roztok cysteinu:destilovaná voda). Takto vznikne řada o 4 sestupných koncentracích, přičemž základní roztok je 0,2 μM .

Kalibrační řada:

0,2 μM → 0,1 μM → 0,05 μM → 0,025 μM

Při kalibraci se do kyvety místo daného vzorku (hemolyzát krve, mozek, bránice) nepipetuje stejný objem (0,2 ml) roztoku cysteinu z připravené kalibrační řady. Přidá se roztok DTNB v Tris pufru a reakce se odstartuje přidáním substrátu ATChI. Měří se proti slepému vzorku, v kterém je ATChI nahrazen vodou. (Obr. 15)

5.5 Postup stanovení měření

- v krvi

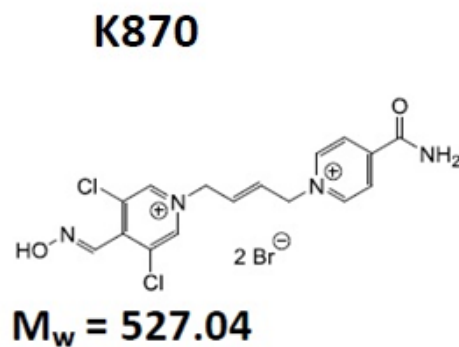
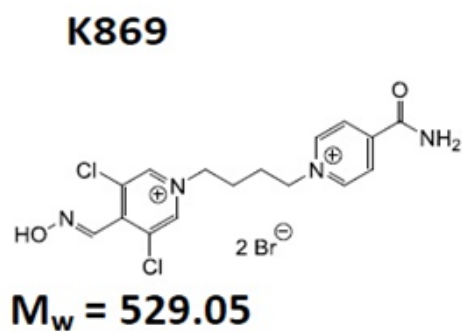
Odebraný vzorek heparinizované krve se nejdříve promíchá, poté se z něj odebralo do zkumavky 100 μl a následně se smíchalo s 1,9 ml 0,02 M Tris pufru. Zkumavka se nechala určitou dobu stát, než došlo k hemolýze, pozorovatelné mírným projasněním roztoku. Poté se do 2,5 ml jednorázové kyvety přidalo 1,7 ml DTNB, 100 μl připraveného hemolyzátu a celá reakce byla zahájena přidáním substrátu 200 μl ATChI. Kyveta se důkladně promíchala a po vložení do spektrofotometru Helios Alpha byla měřena příslušná absorbance při vlnové délce 436 nm po dobu 5 minut (4 min stojí a 1 min měří) při teplotě 25°C. Vlnová délka byla modifikována na hodnotu 436 nm z důvodu vzniku výrazných indiferencí s hemoglobinem při standardní vlnové délce 412 nm. (Obr. 10)

- v mozku

Prvním krokem měření bylo stanovení hmotnosti jednotlivých vzorků mozku. Ty byly naředěny v poměru 1:9 0,02 M Tris pufrem a pak se vše zhomogenizovalo homogenizátorem (DI-25 Basic, IKA Werke, Německo). Dále byl postup měření identický s měřením v krvi, tedy do kyvety se napipetovalo 1,7 ml DTNB, 100 μ l připraveného homogenizátu a nakonec 200 μ l ATChI. Kyveta se důkladně promíchala a po vložení do spektrofotometru Helios Alpha byla měřena příslušná absorbance při standartní vlnové délce 412 nm po dobu 3 minut (2 min stojí a 1 min měří) při teplotě 25°C. (Obr. 11)

- v bránici

Postup byl obdobný jako při měření v mozku, měření však probíhalo 10 minut (8 min stojí a 2 min měří) při teplotě 25°C. (Obr. 12)



Struktura testovaných reaktivátorů

5.6 Uspořádání pokusů

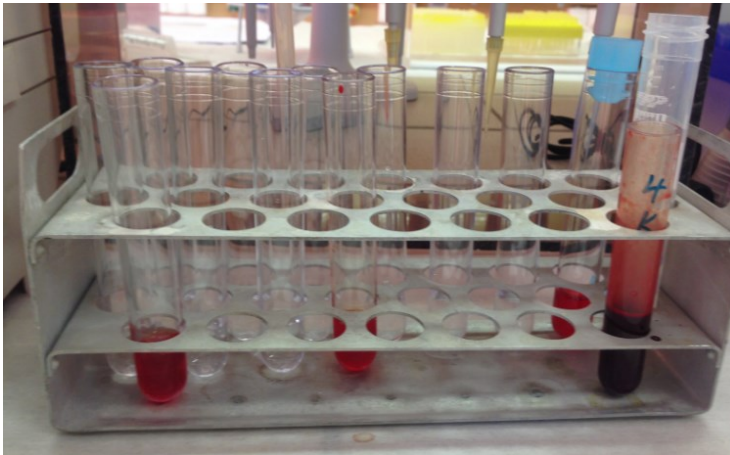
Vlastní práce byla rozdělena do dvou fází. V první fázi byly testu podrobeny 4 skupiny po 6 laboratorních potkanech. První skupina byla skupinou kontrolní (K), které byl podáván fyziologický roztok místo dané NPLP a za 1 min atropin (10 mg/kg), jakožto funkční antidotum AChE. Další skupině byla již podávána NPLP a to konkrétně sarin ($LD_{50} = 70 \mu\text{g/kg}$) a za 1 min atropin (10 mg/kg). Třetí skupině byl podáván sarin ($LD_{50} = 70 \mu\text{g/kg}$), za 1 min atropin (10 mg/kg) a kvartérní reaktivátor pralidoxim methansulfonát K160 (197mg/kg). Poslední skupině byl podáván sarin ($LD_{50} = 70 \mu\text{g/kg}$), za 1 min atropin (10 mg/kg) a následně testovaný reaktivátor AChE - K869 (81 mg/kg).

V druhé fázi probíhalo měření obdobně, bylo použito pět skupin o 6 jedincích. První skupina byla kontrolní (K), další skupině byla již podáván sarin ($LD_{50} = 70 \mu\text{g/kg}$) a za 1 min atropin (10 mg/kg). Třetí skupině byl podáván sarin ($LD_{50} = 70 \mu\text{g/kg}$), za 1 min atropin (10 mg/kg) a kvartérní reaktivátor HI-6 dichlorid K323 (81 mg/kg). Čtvrté skupině byl podáván sarin ($LD_{50} = 70 \mu\text{g/kg}$), za 1 min atropin (10 mg/kg) a kvartérní reaktivátor pralidoxim methansulfonát K160 (197 mg/kg) a poslední pátá skupina dostávala sarin ($LD_{50} = 70 \mu\text{g/kg}$), za 1 min atropin (10 mg/kg) a testovaný reaktivátor K870 (100 mg/kg). Všechny dávky reaktivátorů byly podány v ekvitoxických dávkách odpovídajících 5% jejich dříve zmíněných hodnot LD_{50} . (Kassa et al., 2008)

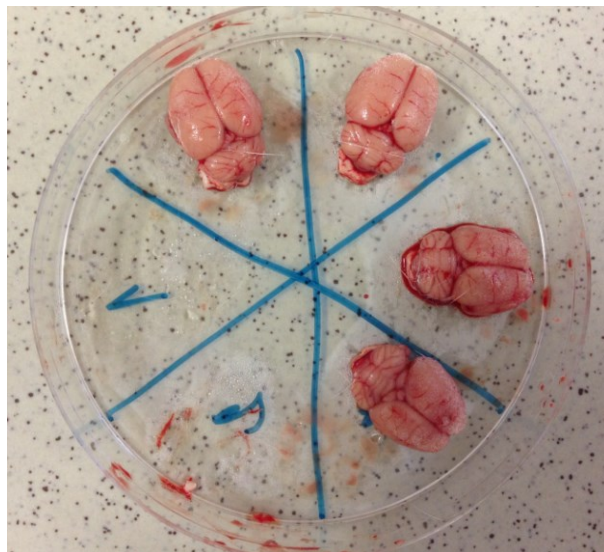
5.7 Zpracování výsledků

Aktivita AChE byla odvozena z hodnot absorbancí pomocí kalibrační křivky cysteinu a vyjádřena jako ukat/ml ($1 \mu\text{mol}$ hydrolyzovaného substrátu/ml tkáně, krve za sekundu). Procenta reaktivace byly vyjádřeny pomocí aktivit AChE dle (rov. 1). Viz Tab. 4-9

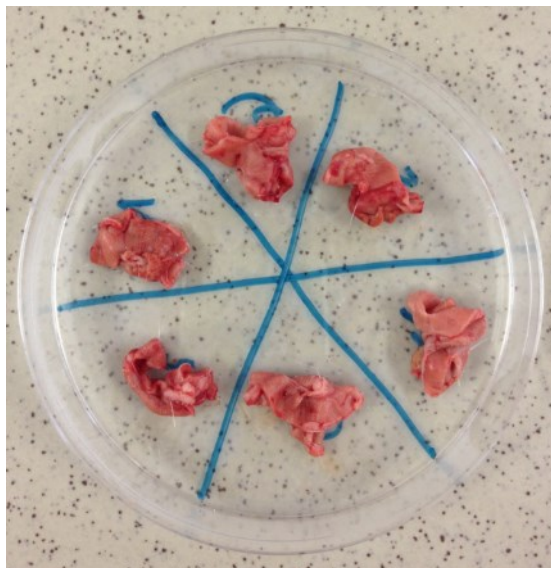
V počítačovém programu Microsoft Excel byly vytvořeny grafy znázorňující aktivitu AChE (v ukat/ml) po podání reaktivátoru v porovnání s kontrolním roztokem K, který neobsahuje reaktivátor, jedná se pouze o vzorek s přidaným fyziologickým roztokem. Viz Obr. 16-21



Obr. 10 : Vzorke hemolyzované krve potkana



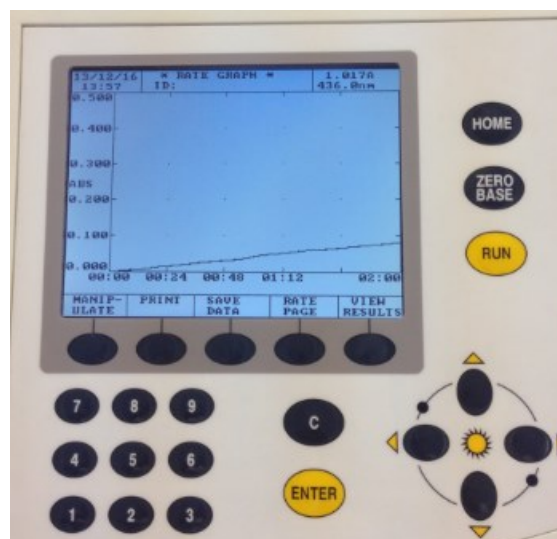
Obr. 11: Vzorke mozku potkana



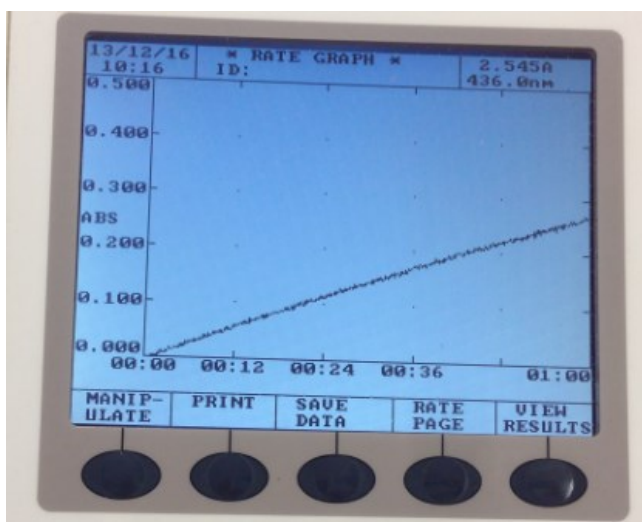
Obr. 12: Vzorke potkaní bránice



Obr. 13 : Spektrofotometr Helios alpha



Obr. 14 : Křivka měřené aktivity AChE



Obr. 15 : Křivka kalibrační řady

6. Výsledky

Měření každého vzorku se opakovalo dvakrát. Naměřené hodnoty absorbance byly přepočítány na procenta aktivity AChE, z čehož lze určit účinnost testovaných reaktivátorů. V grafech je vyznačená aktivita enzymu AChE v ukat/l a jednotlivé směrodatné odchylky měření (SD).

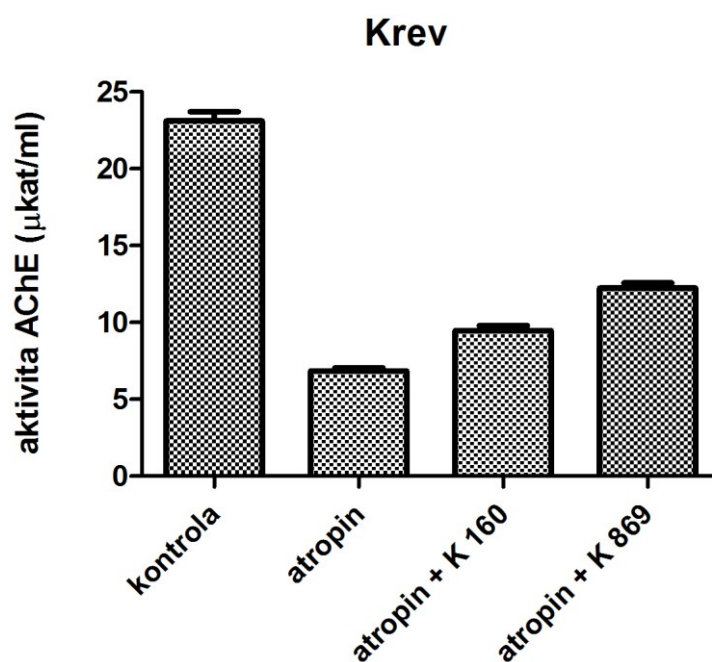
Čím vyšší je hodnota aktivity AChE v ukat/ml v porovnání s kontrolním roztokem K, tím vyšší účinnost reaktivátorů lze pozorovat.

$$R = \left(1 - \frac{\Delta A_0 - \Delta A_r}{\Delta A_0 - \Delta A_i} \right) \times 100 \quad [\%] \quad (\text{Rov. 1})$$

ΔA_0 vyjadřuje změny absorbance neinhibované AChE (fyziologický roztok byl použit místo roztoku inhibitoru)

ΔA_i vyjadřuje změny absorbance inhibované AChE

ΔA_r vyjadřuje změny absorbance reaktivované AChE.

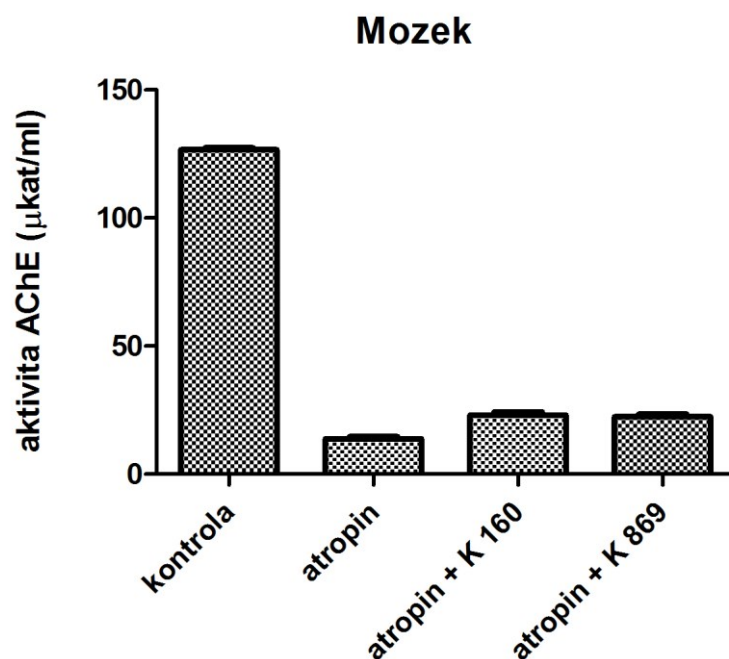


Obr. 16: Aktivita sarinem inhibované AChE v plné krvi potkana v přítomnosti testovaných látek

Tab. 4 Aktivita AChE v krvi

Aktivita AChE vyjádřená v ukat/ml		Procenta zvýšené aktivity (%)
1. Atropin	6,84	
2. Atropin + K160	9,46	16
3. Atropin + K869	12,23	33

Aktivita neinhibované AChE v krvi byla 23,13 ukat/ml. Zkoušený reaktivátor K869 měl hodnotu aktivity 12,12 ukat/ml a vykázal zlepšení o 33 % oproti intoxikované skupině. Standard K 160 měl zlepšení o 16 % oproti intoxikované skupině a jeví se jako o polovinu účinnější v krvi než používaný komerčně dostupný pralidoxim.

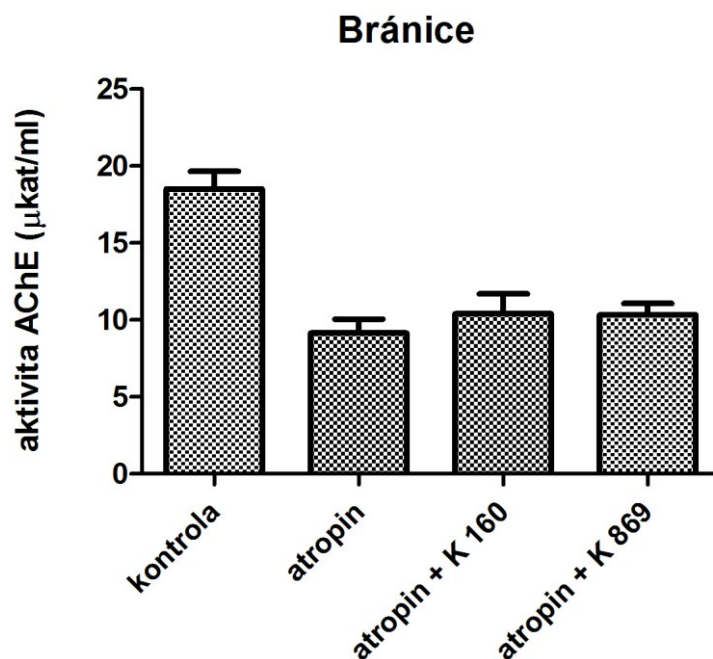


Obr. 17: Aktivita sarinem inhibované AChE v potkaním mozku v přítomnosti testovaných látek

Tab. 5 Aktivita AChE v mozku

Aktivita AChE vyjádřená v ukat/ml		Procenta zvýšené aktivity (%)
1. Atropin	13,76	
2. Atropin + K160	23,12	8
3. Atropin + K869	22,47	8

U mozku je hodnota neinhibované AChE 126,6 ukat/ml. Testované látky K160 a K869 dosáhly srovnatelného zlepšení o 8 % oproti hodnotě intoxikované skupiny. Výsledky jsou podstatně nižší než hodnoty reaktivace v krvi. Reaktivátor K869 je téměř 4x účinnější v krvi než v mozku podle našich výsledků.



Obr. 18: Aktivita sarinem inhibované AChE v bránici potkana v přítomnosti testovaných látek

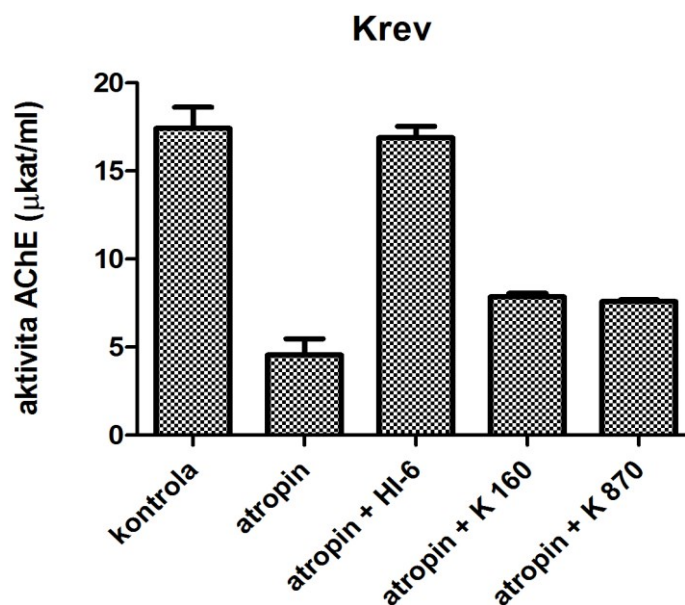
Tab. 6 Aktivita AChE v bránici

Aktivita AChE vyjádřená v ukat/ml		Procenta zvýšené aktivity (%)
1. Atropin	9,16	
2. Atropin + K160	10,41	13
3. Atropin + K869	10,35	13

Zjištěná hodnota neinhibované AChE v bránici je 18,51 ukat/ml. U látek K160 i K869 nastalo zlepšení o 13 % oproti intoxikované skupině. Výsledky reaktivace jsou vyšší, než ty, které byly u reaktivátorů K 869 a K 160 naměřeny v mozku. Oba vykazují o 5 % vyšší schopnost reaktivace na periférii než v CNS.

V rámci prvního měření prokázal zkoušený reaktivátor K869 výrazné zlepšení reaktivace oproti intoxikované skupině v krvi (zlepšení o 33 %) a v bránici (zlepšení o 13 %). V mozku nastalo zlepšení o 8 %, což je však terapeuticky méně významné, jelikož hledáme reaktivátor zmírňující zejména centrální příznaky.

Druhé měření probíhalo obdobně a zkoušený reaktivátor K870 byl porovnáván s dalšími 2 kvartérními reaktivátory HI-6 a pralidoxim methansulfonátem (K160).

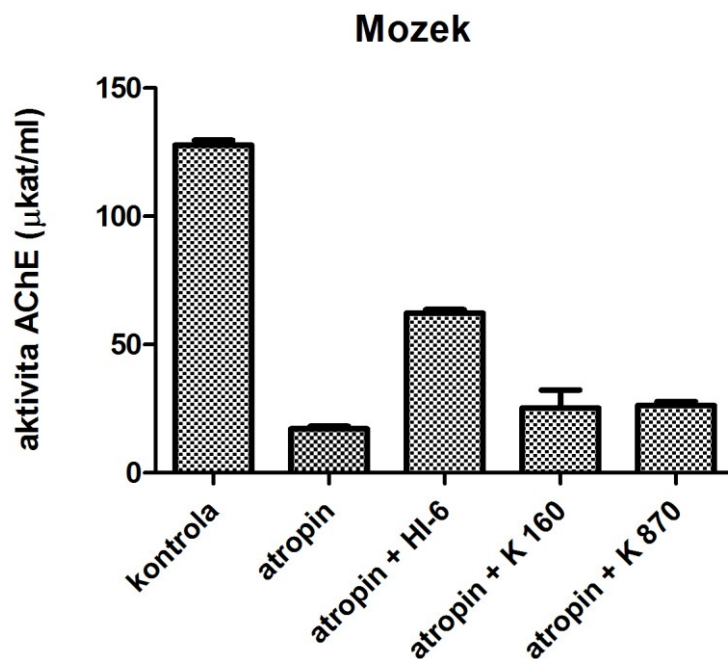


Obr. 19: Aktivita sarinem inhibované AChE v plné krvi potkana v přítomnosti testovaných látek

Tab. 7 Aktivita AChE v krvi

Aktivita AChE vyjádřená v ukat/ml		Procenta zvýšené aktivity (%)
1. Atropin	4,56	
2. Atropin + HI-6	16,89	96
3. Atropin + K160	7,86	26
4. Atropin + K870	7,59	24

Hodnota aktivity neinhibované AChE je 17,43 ukat/ml. Výrazné zlepšení aktivity nastalo u látky HI-6, a to o 96 %, která je již běžně používaná jako optimální lék při zasáhnutí G-látkami. U látek K 160 a K 870 byla zjištěna hodnota reaktivace o 25 % vyšší než hodnota intoxikované skupiny.

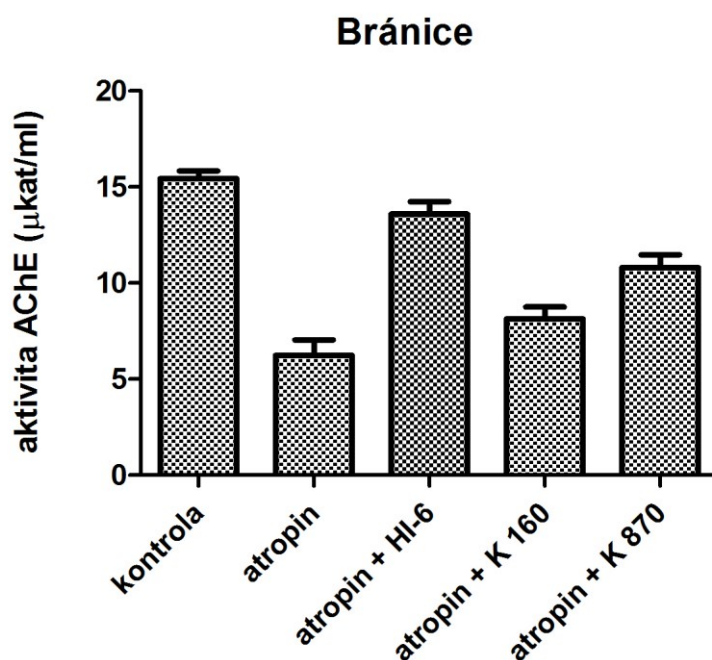


Obr. 20 : Aktivita sarinem inhibované AChE v mozku potkana v přítomnosti testovaných látek

Tab. 8 Aktivita AChE v mozku

Aktivita AChE vyjádřená v ukat/ml		Procenta zlepšení aktivity (%)
1. Atropin	17,24	
2. Atropin + HI-6	62,36	41
3. Atropin + K160	25,32	7
4. Atropin + K870	26,36	8

Hodnota aktivity neinhibované AChE byla 127,9 ukat/ml. Z této tabulky vyplývá, že v mozku bylo zjištěno zlepšení u K 160 a K 870 o téměř 8 %, což je výsledek obdobný jako při měření v mozku v rámci předchozího pokusu u látky K 869. Nejvýznamnější obnovení účinnosti AChE lze zaznamenat zejména u reaktivátoru HI-6 v koncentraci 81 mg/kg již zavedeného do léčebné praxe, kdy hodnota aktivity AChE dosáhla zlepšení o 41% oproti intoxikované skupině, což je terapeuticky nejvýznamnější výsledek.



Obr. 21 : Aktivita sarinem inhibované AChE v bránici potkana v přítomnosti testovaných látek

Tab. 9 Aktivita AChE v bránici

Aktivita AChE vyjádřená v ukat/ml		Procenta zvýšené aktivity (%)
1. Atropin	6,25	
2. Atropin + HI-6	13,59	80
3. Atropin + K160	8,14	21
4. Atropin + K870	10,82	50

Aktivita neinhibované AChE byla 15,44 ukat/ml. Naměřená hodnota reaktivace u bránice byla pro látku K870 o 50 % vyšší oproti intoxikované skupině, což je skoro 2x vyšší výsledek než při měření v krvi. Při porovnání výsledků reaktivačního účinku standardů na periférii dosáhl nejvyššího zlepšení standard HI-6 a to o 80 % a druhý standard K160 zlepšil aktivitu AChE obdobně jako v krvi o 21 %.

7. Diskuze

Vysoce toxické sloučeniny organického fosforu jsou považovány za nejnebezpečnější chemické bojové látky. Nejdůležitějšími zástupci NPL jsou tabun, sarin, soman, cyklosarin a VX. Představují potenciální neurotoxickou hrozbu pro vojenské i civilní obyvatelstvo, jak dokazují teroristické útoky spáchané v minulých letech. Například zneužití sarinu na japonské civilisty v metru v roce 1995, zahrnující tisíce intoxikovaných osob, avšak díky využití adekvátní léčby pralidoximem, mnoho lidí bylo zachráněno. (Jun et al., 2008) Dalším příkladem zneužití sarinu byl útok z roku 2013 v Sýrii ve městě Ghúta, kdy zemřelo více než 1400 civilistů. K poslednímu a poměrně aktuálnímu útoku NPL došlo taktéž v Sýrii. Útok byl spáchán v dubnu 2017 v provincii Idlib a byl namířen proti civilistům, ale zasáhl i zdravotnické zařízení. Jako NPL byl použit opět sarin společně s chlorem.

Jejich akutní toxické účinky jsou založeny na fosforylaci AChE, což vede k nevratné inhibici tohoto enzymu a následné nadměrné stimulaci postsynaptických cholinergních receptorů v důsledku akumulace neurotransmiteru ACh v synapsích centrálního a periferního nervového systému. (Kassa et al., 2007)

Pro základní terapii otrav se používají anticholinergika v čele s atropinem, antikonvulziva a reaktivátory. Hlavním mechanismem účinku reaktivátorů AChE je vytěsnění OFI z vazby enzymu a tím obnovení jeho funkce. Tato léčba je vhodná jen v počátku otravy, než dojde k fosforylaci a vytvoření kovalentní vazby mezi OFI a esterazou. Jako lékem volby při akutní otravě je atropin, který byl použit i v naší studii. Antagonizuje účinek nahromaděného ACh na periferních muskarinových receptorech. (Bajgar, 1972) Neváže se však na receptory nikotinové a nezabrání tak příznakům otravy jako je svalový třes či ochrnutí svalstva. Jen v malé míře ovlivňuje centrální příznaky intoxikace, jelikož špatně prostupuje přes HEB. Tato tvrzení jsou patrná i z naší studie, neboť inhibovaná AChE měla po podání atropinu jen přibližně 10 % své původní aktivity při měření v mozku, což by v takovém případě bez následné terapie reaktivátorem vedlo ke smrti dané skupiny zvířat. (Karasová et al., 2009)

Při našem pokusu byl použit sarin a to i přesto, že léčba otravy sarinem se jeví jako snadnější ve srovnání s léčbou intoxikace somanem a tabunem. (Kuca, 2005) V minulosti byl vývoj zaměřen především na soman, protože u něj probíhá proces

dealkylace komplexu AChE-inhibitor velmi rychle, řádově v několika minutách a proto je léčba otravy považována za obtížnou. Však z důvodu stále častějších a aktuálnějších teroristických útoků za použití sarinu se hledají vhodná antidota právě při otravě touto toxikou a zároveň současná problematika NPL zahrnuje další fakt, že stále neexistuje širokospektrý reaktivátor AChE vůči všem typům OFI, který by navíc prostupoval do CNS, a proto je potřeba hledat a testovat stále nové struktury reaktivátorů jako řešení k překonání těchto problémů. (Kuca et al., 2004)

Cílem této práce bylo vyhodnotit účinnost reaktivace dvou nově nasyntetizovaných látek K869 a K870. Výsledky testovaných látek, zjištěné při měření v krvi, bránici a mozcích potkanů, byly srovnávány se standardy HI-6 dichloridem a s látkou K 160 (pralidoximem). Jelikož pokus probíhal na živých potkaních jedincích, kdy každý z nich může reagovat na podanou látku odlišným způsobem a měření výsledků daných skupin se konalo v různých dnech, byly vždy u každého pokusu měřeny kontroly. Určitá odchylka může být přisuzována outbrední populaci zvířat a variabilitě podmínek měření. Sarin existuje navíc ve formě optického izomeru a je možné, že jednotlivé stereoizomery mají různé toxikologické vlastnosti a mohou reagovat s AChE různě. I navzdory tomuto, jsme však získali kvantitativně hodnotitelné výsledky reaktivační účinnosti.

Naměřené výsledky reaktivace jsou pozitivní v případě, když dojde ke zvýšení reaktivace oproti intoxikované skupině o více než 10 % a díky tomu může dojít k záchraně intoxikovaného organismu a snížení toxických příznaků danou NPL. (Karasová J., 2009) Podle (Bajgar, 2004) je pro přežití intoxikovaných jedinců potkanů nezbytná 5% reaktivační účinnost. Z našich výsledků je patrné, že látky K869 a K870 vykazují významnou terapeutickou účinnost v krvi, kdy zvyšují účinnost reaktivace o 33 % pro K869 a o 24 % pro K870. Substance K870 se projevila také na periférii, kde zvýšila účinnosti reaktivace o 30 % oproti K160. Ze studie Kassa et al., 2014 zaměřenou obdobně na měření účinnosti biskvartérních reaktivátorů, lze potvrdit vysokou reaktivační účinnost standardu HI-6, kdy prokázal zlepšení účinnosti v mozku o 45 %, což se víceméně shoduje i s našim výsledkem. Má nejširší spektrum účinku i nejvyšší účinnost ze všech doposud nasyntetizovaných reaktivátorů. Bohužel nemůže být považován za širokospektrý, protože není schopen reaktivovat AChE inhibovanou tabunem a některými pesticidy. (Kuča et al., 2006)

Podle publikovaných zdrojů je důvodem vysoké terapeutické účinnosti HI-6 také přímý antimuskarinový a anitinkotinový účinek, obnovení neuromuskulárního přenosu, zpomalení procesu dealkylace inhibitor-enzym a inhibice uvolňování ACh. (Kassa, 2006; Rousseaux, 1989) Tato tvrzení nelze našimi výsledky prokázat, protože zkoumání projevů intoxikace nebylo předmětem této práce.

Při testování míry reaktivity v potkaních mozcích se obě testované látky přiblížily k 10 %, podmiňujících záchranu intoxikovaného organismu. Díky chlorací zvýšené lipofilně jsme předpokládali u obou testovaných látek vyšší stupeň reaktivity na úrovni CNS. Obě testované látky dosáhly srovnatelného výsledku jako standard K160 a naše očekávání se potvrdila. Pozitivní vliv substitucí molekulami chloru může být díky udržení nekoplanárního uspořádání oximu a působení elektrostatických a hydrofobních interakcí při vazbě na enzym. (Bieger, 1967)

Při hledání nových struktur oximů se v současnosti výzkum zaměřuje na modifikaci funkčních skupin u biskvartérních sloučenin s jednou oximovou a druhou neoximovou skupinou. Této modifikace bylo použito i při syntéze našich K substancí. Velmi významných výsledků tohoto úsilí dosahuje oxim K203, účinný na AChE intoxikovanou tabunem. (Kassa et al., 2011) Posléze byla testována i jeho účinnosti vůči sarinu, kde se prokázal jako slabý reaktivátor. V krvi byl schopen zvyšovat aktivitu AChE inhibovanou sarinem o 6,3 % a v mozku o pouze 3,1 %. Naše testované látky zlepšovaly aktivitu AChE v mozku o 8 % a v krvi o cca 30 %. Výsledky jsou v porovnání s K203 10x vyšší v krvi a o 5 % vyšší v mozcích a to i přesto, že strukturně se jedná o podobné analogy.

Druhým standardem použitým pro srovnání účinnosti našich testovaných látek byl pralidoxim. Tento reaktivátor je použitelný při otravě sarinem či VX, ale v dalších případech intoxikace není tak efektivní jako H-oximy (HI-6, HI-7). (Kassa, 2002) Na druhou stranu, některé zdroje považují používání pralidoximu za kontroverzní. Je sice jedním z prvních antidot zavedených do klinické praxe, ale vyznačuje se nízkou toxicitou a nadále zůstává součástí antidot proti NPL v armádě USA-NATO.

Podle (Kassa, 2002) je schopnost pralidoximu reaktivovat sarinem inhibovanou AChE v potkaní bránici a mozku je relativně nízká. V bránici dosáhl zlepšení reaktivity o pouhé 1 % a v mozku o 7,2 %. Podle našich výsledků je účinnost reaktivity

pralidoximu v potkaní bránici a mozku vyšší o 9 %, čehož mohlo být dosaženo použitím jiné soli - pralidoxim methansulfonátu, jiné koncentrace, měřením v jiném čase či chybou měření.

V procesu reaktivace hraje významnou roli struktura daných reaktivátorů, limitující vstup přes HEB a zmírnění centrálních příznaků. HEB je pro vysoce hydrofilní struktury, jako jsou reaktivátory, kvůli jejich kvartérní struktuře a přítomnosti hydrofilní oximové skupiny relativně neprostupná. (Žďárová-Karasová, 2010) Všechny na trhu dostupné reaktivátory jsou v krvi z velké části disociované, proto je vstup přes HEB nedostatečný. Pro úspěšnou reaktivaci je podstatné znát i hodnotu pKa, která zabezpečuje afinitu k inhibované AChE a pohybuje od 7,04 pro H-oximy do 8,2 pro trimedoxim. (Gorecki, 2016) Tyto hodnoty byly zvoleny tak, neboť pro vlastní reaktivaci je potřeba disociovaného oximátového aniontu, kdežto pro přestup bariérami a zejména HEB, je potřeba molekula nedisociovaná. Díky tomu, jsou oximy schopny vstoupit do CNS, i přesto že jsou silně hydrofilní. Koncentraci v mozku ale odpovídá jen asi na 4-10 % plasmatické hladiny, pokud jsou podány vysoké (neterapeutické) dávky daného oximu. (Lorke, 2008)

Námi testované látky nemají změřenou hodnotu pKa, zabezpečující afinitu k inhibované AChE. Bylo by dobré tuto hodnotu znát a zjistit, zda nehraje roli v zjištěných výsledcích reaktivace a neovlivňuje proces disociace oximátového aniontu.

Obecným faktem je, že sloučeniny biskvartérní (obidoxim) prostupují do CNS v maximu z 6 %, kdežto zástupci monokvartérních oximů jako je pralidoxim, které jsou v porovnání s biskvartérními lipofilnější, prostupují pasivní difúzí z 10 %. (Lorke, 2008, Sakurda et al., 2003) V současnosti je diskutováno, že monokvartérní reaktivátory mají v HEB aktivní transportér prostřednictvím sodíkových pump. (Sakurada, 2003) U biskvartérních nebyl doposud objeven žádný transportní systém.

Námi testované sloučeniny byly vybrány a nesyntetizovány na základě znalosti nejvíce účinných chemických struktur. Jedná se o zástupce biskvartérních reaktivátorů s jednou oximovou a jednou neoximovou skupinou, umístěnými v poloze para na pyridinech. Neoximová funkční skupina může mít schopnost tvořit vodíkové vazby a tím zvyšovat afinitu reaktivátoru k AChE. (Musílek et al., 2007) Spojovací řetězec mezi pyridiny je tvořen 4C a u látky K 870 se liší v přítomnosti dvojnásobné vazby. Spojující řetězec má vliv

na reaktivaci, i když tato část molekuly nehraje žádnou roli v procesu defosfonylace. Zdá se, že tří nebo čtyřuhlíkový řetězec je nevhodnější pro dostatečnou účinnost oximů k reaktivaci inhibované AChE. (Worek et al., 1996)

Obě naše látky mají 4C dlouhý spojující řetězec zabezpečující dobrou účinnost. Zavedením dvojně vazby u K870 se nepatrně zvýšila reaktivační schopnost na periférii, v CNS se jeví srovnatelná s K869. Zavedením dvojně vazby do řetězce není umožněna rotace kolem dvojně vazby, jak je tomu v případě vazby jednoduché a řetězec neumožňuje prostorovou flexibilitu ve štěrbině anionického místa enzymu. Dvojná vazba by tedy měla zaručovat určitou rigiditu struktury při interakci s vnitřkem kavity enzymu. Taktéž zmiňovaná látka K203 má ve spojovacím řetězci dvojnou vazbu, však její vyšší reaktivační účinnost se neprokázala u AChE inhibované sarinem nejspíše z důvodu nedokonalé flexibility. Podle studie (Kassa et al., 2007) zaměřenou na reaktivaci AChE inhibovanou tabunem a cyklosarinem substancemi K075 a K074, liší se dvojnou vazbou ve spojovacím řetězci, přítomnost dvojně vazby nehrála významnou roli v procesu reaktivace. Tato hypotéza by měla být ověřena pomocí metod molekulárního designu, kterým je možno simulovat proces reaktivace na molekulární úrovni. (Kuca et al., 2006)

Reaktivační efekt je spjat zejména s pozicí oximové skupiny na aromátu. Nejsilnější reaktivaci by měly vykazovat molekuly, ve kterých je oximová skupina vzdálená od kvartérního dusíku stejně jako je vzdálenost mezi anionickým a esteratickým místem enzymu, tedy v pozici 2 a 4. V obou testovaných látkách je oxim umístěn v poloze 4 od pyridinového dusíku, zabezpečující dobrou afinitu k AChE. Zmíněné tvrzení je v souladu i s výsledky (Kassa et Cabal, 1999) považující oximy, které mají ve své struktuře pouze jednu oximovou skupinu za významně účinnější v reaktivaci somanem, sarinem a cyclosarinem inhibované AChE než se dvěma oximovými skupinami jako obidoxim, methoxim a trimedoxim.

Struktura nám tedy významně vyjadřuje účinnost daného reaktivátoru, která je závislá na afinitě k inhibované AChE. (Shih, 1993)

Pro zvýšení ochrany CNS před ničivými účinky OPI a s tím spojené zlepšení prognózy zasažených, je potřeba se v budoucnu zaměřit na postupy a metody, které poslouží ke zvýšení jejich průniku z periferního oběhu do CNS. Jednou z možností je

syntéza nové řady reaktivátorů s nekvartérní strukturou, díky které by mohly prostupovat přes HEB a zajistit tak vyšší terapeutickou koncentraci v mozku. Jako další slibná cesta je technologická úprava reaktivátoru do mikrokapičky v řádech 1-2 μm v obalu s lipidovou nebo proteolipidovou povahou- tzv. mikroenkapsulace. Nebo lze ke zvýšení účinnosti reaktivátoru v CNS použít urychlovače průniku látek přes biologické membrány – tzv. penetration enhancers, které zajistí zvýšenou dodávku léku k cílovým orgánům. (Jurczyk, 2010)

Kombinace dvou oximů s odlišným spektrem jejich reaktivační účinnosti se zdá být také možným přístupem ke zvýšení účinnosti antidotní léčby akutní otravy nervovými činidly bez ohledu na jejich chemickou strukturu. (Kassa, 2011)

Všechny výše uvedené body by měly být brány v úvahu, zda tyto nové možnosti strategie jsou opravdu slibným přístupem, nebo jen další slepá cesta při hledání univerzální, širokospektré a dostatečně účinné antidotní léčby.

8. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit účinnost nově nasyntetizovaných reaktivátorů K869 a K870 a porovnat jejich reaktivační účinnost s komerčně dostupnými reaktivátory pralidoximem (K160) a HI-6. Měření probíhalo *in vivo*. Byla stanovena míra reaktivační účinnosti v krvi, mozcích a bránicích potkanů.

Na reaktivační účinnost má vliv nejen struktura daného reaktivátoru, ale také jeho schopnost pronikat přes HEB. Testované reaktivátory patří mezi biskvartérní reaktivátory s jednou oximovou skupinou, umístěnou v poloze *para* na pyridinu. Tyto strukturální znaky mají za následek, že dané reaktivátory díky kvartérní struktuře a hydrofilní oximové skupině poměrně úspěšně potlačují příznaky intoxikace na periférii, což ovšem neplatí pro CNS.

Oba testované reaktivátory lze považovat za účinné při léčbě v AChE inhibované sarinem. Je známo, že aby byl reaktivátor považován za účinný při intoxikaci inhibitory AChE, musí reaktivovat enzym minimálně z 10-20 %, čehož bylo ve všech měřeních dosaženo.

Námi zjištěné výsledky prokázaly vyšší reaktivační schopnost pro obě testované látky v porovnání s pralidoximem na periférii. Avšak nepřevažují nad efektivitou oximu HI-6. Ten dosáhl zlepšení míry reaktivace oproti intoxikované skupině o 41 % v mozku a o 80 % v bránici. Látky K869 a K870 nejsou tedy vhodné pro náhradu běžně používaného oximu při léčbě akutní otravy sarinem.

HI-6 proto nadále zůstává nejslibnějším oximem v antidotní léčbě při akutní intoxikaci sarinem.

Seznam použitých zkratek

Acetyl Co-A	-	acetylkoenzym A
ACh	-	acetylcholin
AChE	-	acetylcholinesterasa
AChR	-	acetylcholinový receptor
ATChI	-	acetylthiocholinjodid
AČR	-	Armáda České republiky
AK	-	aminokyselina
BChE	-	butyrylcholinesterasa
BOL	-	bojovné otravné látky
cAMP	-	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	-	centrální nervový systém
DAG	-	diacylglycerol
DTNB	-	5,5'dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EPSP	-	excitační postsynaptický potenciál
ER	-	endoplazmatické retikulum
FVZ	-	fakulta vojenského zdravotnictví
HEB	-	hematoencefalická bariéra
IP3	-	inositoltrifosfát
IPSP	-	inhibiční postsynaptický potenciál
LD ₅₀	-	dávka látky, která způsobuje smrt u 50 % testované populace

mAChR	-	muskarinový receptor
MG	-	Myaestenia gravis
M ₁₋₅	-	muskarinové receptory typu 1-5
nAChR	-	nikotinový receptor
NMDA	-	N-methyl-D-asparagová kyselina
NPL	-	nervově paralytické látky
OFI	-	organofosfátové inhibitory
OP	-	organofosfát
PIP-2	-	fosfatidylinositol 4,5 -bisfosfát
PKC	-	proteinkináza C
SD	-	směrodatná odchylka měření

Použité zdroje a prameny

Ambler Z. (2010) Neurofyziologie a elektrodiagnostika nervosvalového přenosu. *Neurologie pro praxi*; 11(2): s.81–84.

Bajgar J. (1972) Determination of acetylcholinesterase activity in human blood-possible modification for field conditions. *Vojenské zdravotnické listy*. Vol. 41, s. 78-80.

Bajgar J. (2004) Organophosphates/nerve agent poisoning, mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Adv Clin Chem*; 38: s.151-216.

Bieger D., Wassermann O. (1967) Ionization constants of cholinesterase-reactivating bispyridinium aldoximes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 19.12, s.844-847.

Bolis L., Licinio J., Govoni S. (2005) Handbook of the autonomic nervous system in health and disease. Taylor & Francis e-Library, s.5-7.

Brunovský M. (2007) Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy choroby. *Neurologická praxe*. 2, s.107-111.

Cabal J. a kol. (2004) Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*, Vol. 95, s.81-86.

Cokugras N. (2003) Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turkish Journal of Biochemistry*, 28, s. 54-61.

Čolović M. B. et al. (2013) Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11.3: s. 315-335.

Doležal M. a kol. (2011) Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém, 1. vydání, Praha: Nakladatelství Karolinum, ISBN: 978-80-246-1633-9.

Eyer P. (2003) The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol. Rev.* 22, s. 165-190.

Finkel R. et al. (2008) *Pharmacology*. Lippincott Williams & Wilkins, s. 40-50.

Gannong F. (1995) *Přehled lékařské fyziologie*. H+H, Jinočany, ISBN: 80-85787-36-9.

Gorecki L. et al. (2016) SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorus nerve agents and pesticides, *Archives of toxicology*. 90.12, s.2831-2859.

Holas O. (2012) Vztah mezi strukturou a účinností potenciálních modulátorů acetylcholinesterasy. Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Disertační práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové

Jun D., Kuca K., Picha J., Koleckar V., Marek, J. (2008) Potency of novel oximes to reactivate sarin inhibited human cholinesterases. *Drug and Chemical Toxicology*, 3, s.1-9, DOI:10.1080/01480540701688238.

Jurczyk P. (2010) Studium změny reaktivací účinnosti a možnosti prostupu přes hematoencefalickou bariéru po zavedení fluoru do struktury oximového reaktivátoru acetylcholinesterasy. Katedra farmakologie a toxikologie. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové.

Kassa J., Cabal J. (1999) A comparison of the efficacy of a new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with presently used oximes and H-oximes against sarin by in vitro and in vivo methods. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, s.560-565.

Karasová J. et al. (2009) Je fluorace oximů tou správnou cestou ke zvýšení průniku těchto látek do centrálního nervového systému? *Voj. Zdrav. Listy* 1, 23-27.

Kassa J. (2002) Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *Journal Toxicol. Clin. Toxicol.* Vol. 40, 3, s. 803-816.

Kassa J., Jun D., Kuca K. (2007) A comparison of reactivating efficacy of newly developed oximes (K074, K075) and currently available oximes (obidoxime, HI-6) in cyclosarin and tabun-poisoned rats. *Journal of Enzym. Inhib. Med. Chem.* 22(3), s.296-300.

Kassa, J., Karasova J., Sepsova V. and Caisberger F. (2011) The Benefit of Combinations of Oximes for the Reactivating and Therapeutic Efficacy of Antidotal Treatment of Sarin Poisoning in Rats and Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 109: s.30–34. doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00678.

Kassa J., Zdarová-Karasová J., Sepsová V., Bajgar J. (2011) A comparison of the reactivating and therapeutic efficacy of the newly developed bispyridinium oxime K203 with currently available oximes, in sarin poisoned rats and mice. *J Appl Biomed.*, 9: s.225-230.

Kassa J., Sepsová V., Tumová M. (2014) A comparison of the reactivating and therapeutic efficacy of two novel oximes K378 and K458 with currently available oximes in rats and mice poisoned with sarin. *J. Appl. Biomed.*

Kovarik Z., Calic M., Bosak A., Sinko G., Jelic D. (2008) *Croat. Chem. Acta.* 8, s.47-57.

Kalisiak J., Ralph E., Cashman J. R.. (2012) *J. Med. Chem.*, 55 (1), s. 465–474.

Kuca K., Jun D., Musílek K. (2006) Vliv délky a tvaru spojovacího řetězce biskvartérních reaktivátorů acetylcholinesterasy na jejich schopnost reaktivovat enzym inhibovaný sarinem. *Voj. zdrav. Listy.* Vol. 1, s. 37-40.

- Lincová D., Farahali H. (2007) *Základní aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, s.160-200.
- Lokre et al. (2008) *Current medicinal chemistry*, 15, 5.
- Lüllman H. et al. (2004) *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada Publishing, a.s., s.590-598.
- Martínková J. (2007) *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing a.s., ISBN: 978-80-247-1356-4.
- Martin J., Kršková Z., Dušek J. (2011) Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. Lékařství*;7(1): s.39–41.
- Masuda N., Takatsu M., Morinari H., Ozawa T. (1995) Sarin poisoning in Tokyo subway. *Lancet*. 345, s.1446.
- Musilek K. et al. (2007) Novel series of bispyridinium compounds bearing a (Z) but-2-ene linker – synthesis and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 17:s.3172-74.
- Musilek K., Dolezal M., Gunn-Moore F., Kuca K. (2011) *Med. Res. Rev.*31, s. 548-575.
- Patočka J. et al. (2004) *Vojenská toxikologie*, 1.vyd., Grada Publishing, Praha: ISBN:978-80-247-0608-5.
- Patočka J., Strunecká A., Řípková D. (2001) Cholinesterázy a jejich význam v etiologii, diagnostice a terapii Alzheimerovy choroby. *Čs.Fyziologie*, 50, s.4-10.
- Radic Z., Taylor P. (2006) Structure and function of cholinesterases in Toxicology of organophosphate & carbamate compounds, R.Gupta. Editor. Elsevier Academic Press. London. s.161-186.
- Rousseaux C. et al. (1989) Pharmacology of HI-6 and H-series oxime. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1989, 67, 1183-1189.
- Sakurada K. et al. (2003) Pralidoxime iodide (2-PAM) penetrates across the blood-brain barrier. *Neurochem. Res.* 28:1401-1407.
- Shih T. M. (1993) Comparison of Several Oximes on Reactivation of Soman-Inhibited blood, brain and Tissue Cholinesterase Activity in Rats. *Arch. Toxicol.* 67, s.637-646.
- Soukup O. et al., (2010) Interaction of nerve agent antidotes with cholinergic system. *Current Medical Chemistry*. 2010, 17, s.1-3.
- Sussman J. L. et al. (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. 253, s.872-879.

Ševela K., Ševčík P. a kol. (2002) Akutní intoxikace a léková poškození v intenzivní medicíně. Grada Publishing, Praha: ISBN: 978-80-247-3146-9.

Trojan S. et al. (2003) Lékařská fyziologie. Praha: Grada Publishing, s. 600-650, ISBN: 8024705125.

Vopršalová M., Žáčková P. (2000) Základy toxikologie pro farmaceuty. 1.vyd. Praha: Karolinum, ISBN: 80-7184-282-6.

Worek F. et al. (1996) Reactivation by variol oxime sof human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus compounds, Arch. Toxicol. 70:s.497-503.

Žďárová-Karasová J. et al. (2010) Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinku reaktivátorů. Chem.listy. 104, s. 46-50.

Žďárová-Karasová J. (2010) Stanovení reaktivátorů acetylcholinsterasy a organofosfátů v tkáních-přechod přes bariéry. Dizertační práce. Fakulta vojenského zdravotnictví, s. 119.