

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Pavla Sankotová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analýza neurotoxických látek z jedů zvířat  
Bakalářská práce

2022

Pavla Sankotová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Pavla Sankotová**  
Osobní číslo: **C19195**  
Studijní program: **B05 12A130006 Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Analýza neurotoxických látek z jedů zvířat**  
Téma práce anglicky: **Analysis Of Neurotoxic Substances From Animal Venoms**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši zabývající se strukturou a funkcí nervové soustavy, neurotoxickými látkami z jedů zvířat, jejich rozdělením a působením na nervovou soustavu. Následně zpracujte metody stanovení těchto toxinů.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.**  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza neurotoxických látek z jedů zvířat jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20. 6. 2022

Pavla Sankotová v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

V první řadě velmi děkuji vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za kvalitní vedení, užitečné rady i poznámky a za její drahocenný čas, který se mnou strávila při konzultacích.

Dále děkuji své rodině a svým přátelům, za trpělivost, ochotu a podporu během psaní bakalářské práce, ale i během celého studia.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce je věnována neurotoxickým složkám jedů získaných z různých druhů zvířat i jejich tělesných částí. Na úvod byla popsána struktura a funkce nervové soustavy a přenos nervového vzruchu, následně je zmíněno rozdělení neurotoxických látek podle způsobu, jakým působí na nervovou soustavu. Nakonec jsou zpracovány některé neurotoxické látky pocházející z jedů zvířat, rozdělené podle toho, z které skupiny zvířat byly získány, dále byl popsán jejich účinek na nervový systém a část byla také věnována analýze samotných jedů či jejich analýze z různých biologických materiálů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Neurotoxické látky, zvířecí jedy, nervová soustava, neuron, analýza, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

## **TITLE**

Analysis of neurotoxic substances from animal venoms

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis is devoted to neurotoxic components of poisons obtained from different species of animals and their body parts. At the beginning the structure and function of the nervous system and the transmission of nervous excitement are described, then the classification of neurotoxic substances according to the way they act on the nervous system is mentioned. Finally, some neurotoxic substances derived from animal venoms are treated, divided according to the group of animals from which they were obtained, their effect on the nervous system was further described, and a section was also devoted to their analysis from the venoms themselves or their analysis from various biological materials.

## **KEYWORDS**

Neurotoxic substances, animal poisons, nervous system, neuron, analysis, liquid chromatography, mass spectrometry

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	9
SEZNAM TABULEK .....	10
SEZNAM ZKRATEK .....	11
0 ÚVOD.....	14
1 NEUROTOXICITA.....	15
2 NERVOVÁ SOUSTAVA.....	16
2.1 Neuron .....	16
2.2 Průběh vzniku a přenosu nervového vzruchu .....	17
2.3 Základní stavba neuronu .....	17
2.4 Rozdělení neuronů .....	18
2.5 Smrt neuronů.....	18
2.6 Propojení nervových buněk mezi sebou .....	19
2.6.1 Rozdělení synapse podle druhu zapojených buněk .....	19
2.6.2 Rozdělení synapse podle druhu přenosu signálu .....	20
2.6.3 Popis synapse.....	21
2.7 Děje v synapsích .....	21
2.7.1 Neurotransmitery .....	21
2.7.2 Proces uvolňování neurotransmiteru .....	22
2.8 Klidový membránový potenciál.....	22
2.9 Místní potenciály a akční potenciál .....	22
2.9.1 Akční potenciál .....	23
2.10 Vazba na receptory .....	25
2.10.1 Excitační postsynaptický potenciál.....	25
2.10.2 Inhibiční postsynaptický potenciál .....	25
2.11 Odstranění mediátoru.....	25
3 NEUROTOXICKÉ LÁTKY.....	26
3.1 Neurotoxické látky přímo poškozující neurony.....	26
3.2 Neurotoxické látky ovlivňující přenos nervových vzruchů .....	26
3.3 Neurotoxické látky návykové .....	29
4 NEUROTOXICKÉ LÁTKY POCHÁZEJÍCÍ Z ŽIVOČICHŮ.....	30
4.1 PAVOUČÍ JEDY .....	30
4.1.1 Hanatoxin.....	30



4.1.2 Omega-grammotoxin SIA.....	30
4.1.3 SGTx1 .....	30
4.1.4 Jingzhaotoxin .....	30
4.1.5 Hainantoxin.....	31
4.1.6 Analýza a izolace pavoučích toxinů .....	31
4.2 ŠTÍŘÍ JEDY .....	32
4.2.1 Kurtoxin .....	32
4.2.2 Birtoxin a ikitoxin.....	32
4.2.3 Charybdotoxin .....	32
4.2.4 Kaliotoxin a agitoxin .....	32
4.2.5 Analýza a izolace štířích jedů .....	32
4.3 JEDY HADŮ .....	33
4.3.1 Dendrotoxin .....	33
4.3.2 Kobrotoxin.....	33
4.3.3 Fasciculin .....	33
4.3.4 Analýza hadích jedů.....	33
4.4 JEDY MOŘSKÝCH ŽIVOČICHŮ .....	34
4.4.1 Tetrodotoxin.....	34
4.4.2 Saxitoxin .....	40
4.5 JEDY OBOJŽIVELNÍKŮ .....	45
4.5.1 Batrachotoxin.....	45
4.5.2 Epibatidin.....	46
4.5.3 Analýza jedů obojživelníků .....	46
4.6 PTAČÍ JEDY .....	47
4.6.1 Homobatrachotoxin .....	47
4.6.2 Analýza ptačího jedu .....	48
5 ZÁVĚR .....	49
POUŽITÁ LITERATURA .....	50

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Neuron
Obrázek 2	Synapse
Obrázek 3	Graf průběhu akčního potenciálu
Obrázek 4	Strukturní vzorec acetylcholinu
Obrázek 5	Strukturní vzorec muskarinu
Obrázek 6	Strukturní vzorec nikotinu
Obrázek 7	Strukturní vzorec turbokurarinu
Obrázek 8	Strukturní vzorec tetrodotoxinu
Obrázek 9	Schéma konverze TTX na C9-bázi-TMS
Obrázek 10	Strukturní vzorec saxitoxinu
Obrázek 11	Obecný strukturní vzorec analogů saxitoxinu
Obrázek 12	Strukturní vzorec karbamoylu
Obrázek 13	Strukturní vzorec N-sulfokarbamoylu
Obrázek 14	Strukturní vzorec dekarbamoylu
Obrázek 15	Strukturní vzorce analogů saxitoxinu a gonyautoxinu
Obrázek 16	Strukturní vzorec batrachotoxinu
Obrázek 17	Strukturní vzorec epibatidinu
Obrázek 18	Strukturní vzorec homobatrachotoxinu

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1                      Výsledky analýzy vzorků krve a séra tří pacientů

## SEZNAM ZKRATEK

AGTx	Agitoxin
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
BTX	Batrachotoxin
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
CEIA- EC	Imunoanalytická kapilární elektroforéza s elektrochemickou detekcí (Capillary Electrophoresis Immunoassay with Electrochemical detection method)
CNS	Centrální nervová soustava
dc-STX	Dekarbomoylsaxitoxin
dc-NeoSTX	Dekarbomoylneosaxitoxin
dc-GTX1-4	Dekarbomoylgonyautoxin 1-4
ESI-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (Electrospray Ionization Mass Spectrometry)
EPSP	Excitační postsynaptický potenciál (Excitatory Postsynaptic Potential)
GABA	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná (Gamma-Aminobutyric Acid)
GC/MS-SIM	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií a s detektorem s vybraným monitorováním iontů (Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Selected Ion Monitoring)
GTX	Gonyautoxin
GTX(1-4)-Gluc	Gonyautoxin(1-4)-glukuronid
HNTx	Hainantoxin
HaTx	Hanatoxin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

HPLC-FLD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí (High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector)
HRP	Křenová peroxidáza (Horseradish Peroxidase)
CHTx	Charybdotoxin
IA	Imunotest (Immunoassay)
IPSP	Inhibiční postsynaptický potenciál (Inhibitory Postsynaptic Potential)
IS	Vnitřní standard (Internal Standard)
JZTx	Jingzhaotoxin
KMP	Klidový membránový potenciál
KTx	Kaliotoxin
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)
LSD	Diethylamid kyseliny lysergové (Lysergic Acid Diethylamide)
MBA	Biotest na myši (Mouse Bioassay)
MU	Myší jednotka (Mouse Unit)
NeoSTX	Neosaxitoxin
PC-HILIC	Fosforylcholinová hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (Phosphorylcholine Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
PN	Periferní nervy
PSP	Paralytické otravy měkkýšů (Paralytic Shellfish Poisoning)
PST	Paralytické koryšovitě toxiny (Paralytic Shellfish Toxins)
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography)
SEA	Kyselina 11-saxitoxinethanová
SPE	Extrakce tuhou fází (Solid-Phase Extraction)
STX	Saxitoxin

STX-uk	Karbamoyl-N-methylsaxitoxin
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilyl
TTX	Tetrodotoxin
UPLC-MS/MS	Ultra účinná kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)

## 0 ÚVOD

Každé zvíře se musí nějak chránit před okolím a predátory. Některá zvířata, například pavouci, hadi nebo štíři, si vzhledem ke své menší velikosti vytváří na obranu jedy. Ty se po útoku zvířete dostanou do organismu, začnou negativně působit na různé orgánové soustavy a narušovat metabolismy v organismu. Jiná zvířata, například z čeledi čtverzubcovitých nebo někteří měkkýši, zase obsahují jedy produkované bakteriemi. Tyto jedy přijímají v potravě a neslouží jako hlavní obranný mechanismus. Otrava je pak způsobena tím, že dojde k nesprávné úpravě pokrmu ze zvířete a člověk tyto otrávené organismy následně zkonzumuje.

Tato bakalářská práce bude zejména zaměřena na složky zvířecích jedů narušující činnost nervové soustavy a přenos nervového vzruchu, které nazýváme neurotoxické. Neurotoxické jedy nemusí být vždy smrtící, ve většině případů záleží na množství jedu, které se do organismu dostane.

Mírná otrava těmito látkami se projevuje lehkým mravenčením, sníženou citlivostí, svalovou slabostí či křečemi, třesem nebo ztrátou motoriky. Pokud se do organismu dostane větší dávka toxinů, může způsobit selhání dýchacích svalů či zástavu srdce a následnou smrt.

Tyto látky lze pak stanovit různými analytickými metodami z jedů zvířat či z biologických materiálů odebraných od otrávených pacientů.

# 1 NEUROTOXICITA

## Toxikologie

Toxikologie je obecně známa jako věda zabývající se jedy. Jed je látka, která člověka může zabít nebo alespoň nějakým způsobem poškodit. Velmi důležité je v tomto případě množství jedu, které se do těla dostane. Velikost dávky často rozhoduje mezi životem a smrtí otráveného člověka. Jako toxin nazýváme jed, který je živočišného, rostlinného nebo mikrobiálního původu.

## Orgánová toxicita

Jednotlivé toxické látky působí různými způsoby na orgány lidského těla. Někdy mohou ovlivňovat orgány v celém těle, ale často působí pouze na jeden konkrétní orgán. Na základě toho, na jaký orgán látka primárně působí, rozlišujeme různé druhy toxicity, např.:

- **hepatotoxicita** – cílový orgán jsou játra,
- **nefrotoxicita** – cílový orgán jsou ledviny,
- **pneumotoxicita** – cílový orgán jsou plíce a dýchací ústrojí,
- **imunotoxicita** – cílem je narušení funkce imunitního systému,
- **neurotoxicita** – cílem je narušení funkce nervového systému.

**Neurotoxicita** je druhem orgánové toxicity, při působení neurotoxické látky je cílový orgán nervový systém. Na rozdíl od ostatních orgánů, nervový systém v organismu nelze konkrétně lokalizovat, je rozmístěn po celém těle. Je ale velmi důležitý, protože má na starost funkci regulační a zároveň ovlivňuje činnost všech ostatních orgánů v těle [1].



## 2 NERVOVÁ SOUSTAVA

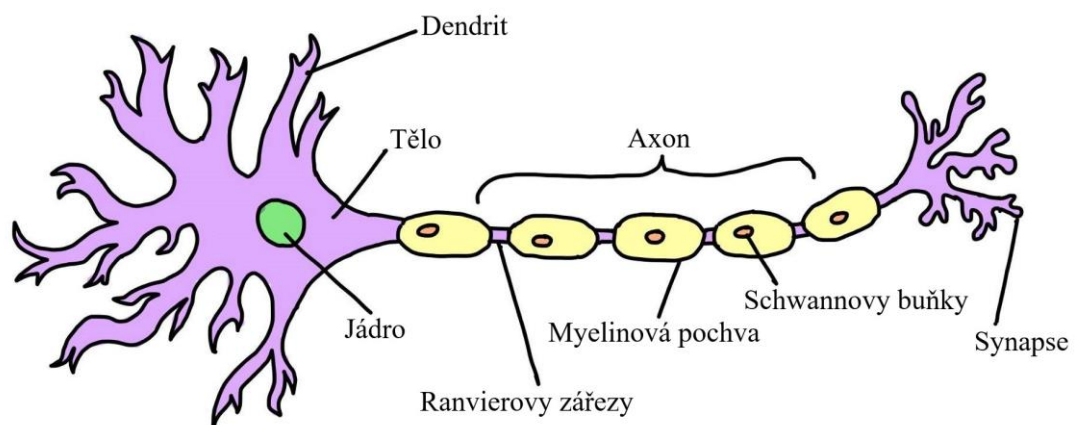
Nervová soustava má v lidském těle důležitou funkci a postavení. Jejím prostřednictvím tělo vnímá veškeré signály z okolního světa, které následně zpracovává a vyhodnocuje, a podle toho pak reaguje na změny okolního prostředí. Jak již bylo zmíněno, nervová soustava také zásadně ovlivňuje činnost dalších orgánů v těle. Umožňuje tělu například upravit průtok krve cévami (rozšiřováním nebo zužováním cév) a tím také ovlivnit přísun kyslíku a živin do různých částí těla. Dále ovládá vznik kontrakce svalu a jeho následné uvolnění, mimo jiné má vliv i na dýchání, trávení a rozmnožování. Nejdůležitější je však jeho centrální část – mozek, který řídí celé tělo a zároveň umožňuje myšlení i vnímání emocí, je proto pro náš život nezbytný [1;2].

Hlavní funkcí nervové soustavy je, že přijímá podráždění přicházející z receptorů, následně ho zpracovává a posílá do těla odpověď, která způsobí činnost výkonných orgánů v organismu. Zároveň slouží ke koordinaci všech částí organismu [3].

Nervová soustava se dělí na dvě základní části: centrální nervový systém (CNS), kam patří především mozek a mícha, a na periferní nervy (PN) [1;3].

### 2.1 Neuron

Základní jednotka umožňující nervové řízení je **neuron** (obr. 1). Jedná se o velmi specializovanou buňku, sloužící k přenosu nervového vzruchu. Od ostatních buněk se liší tím, že se většinou není schopna dělit a rozmnožovat, a zároveň má také odlišný tvar [4].



Obrázek 1 – Neuron (převzato a upraveno z [5])

## 2.2 Průběh vzniku a přenosu nervového vzruchu

Abychom získali vzruch, musí nejprve dojít ke vzniku vnějšího podnětu. Tento podnět je následně zaznamenaný speciálními buňkami zvanými receptory. Receptory podnět převedou na vzruch, který je poté převáděn do nervového centra a z něho na dané výkonné orgány tzv. efektor. Proces, který je zde popsán, tedy přenos vzruchu z receptoru na efektor, se označuje jako reflex [4].

## 2.3 Základní stavba neuronu

Hlavní část buňky tvoří **tělo**, ze kterého vybíhá velké množství různě dlouhých výběžků. Tělo obsahuje stejně jako klasické buňky velké množství organel, velké nápadné jádro a velký počet mitochondrií [2;4;6].

Kratší výběžky vycházející z těla se nazývají **dendrity**, jsou to vstupní části neuronu, primárně slouží k příjmu signálů z okolí a jejich následnému zpracování [2;4;6].

Každý neuron má pak minimálně jeden delší výběžek, který se nazývá **axon** (jinak také neurit), ten pouze vede signál k dalšímu přenosu. Rozlišujeme dva různé typy axonů, první z nich nejsou obalené pochvou, jsou tzv. nahé, ty se označují jako šedá nervová vlákna.

Často je ale axon chráněn dvojitou pochvou: první je Myelinová pochva, vnitřní, nesouvislá, tvořená převážně tukem, přerušovaná Ranvierovými zářezy. Druhá je Schwanova pochva, ta je vnější a je tvořena Schwanovými buňkami, její funkcí je ochrana předtím, aby se vzruch šířil mezi sousedními vlákny neuronů. Čím silnější tedy pochva je, tím rychleji dokáže vlákno vést vzruch. Mluvíme o nich jako o bílých nervových vláknech [2;4;6].

Další důležitou součástí neuronu je **iniciální segment**. Ten spojuje tělo neuronu s axonem a jedná se o místo vzniku akčního potenciálu [2;4;6].

## 2.4 Rozdělení neuronů

Neurony lze také rozdělit podle toho, jakým směrem vedou nervový vzruch. Prvním typem jsou **aférentní** neboli přívodní neurony, ty vedou signál od receptorů do nervového centra. Druhým typem jsou **eférentní**, jinak nazývané odvodní neurony, které vedou signál z nervového centra k efektorům [6].

Dále lze neurony také rozlišovat **podle funkce** na motorické, senzitivní, autonomní a interneurony [2].

**Motorické nervy** slouží hlavně k vedení informací z nervového centra ke kosterním svalům, **senzitivní neurony** mají za úkol převádět smyslové vjemy z místa podnětu zaznamenaného receptorem do nervového centra, **autonomní neurony** nebo také vegetativní neurony vedou k vnitřním orgánům a tkáním a jejich činnost nelze ovládat vůlí. Posledním druhem jsou **interneurony**, ty se nachází v celém nervovém centru: v mozku, hřbetní míše i nervových uzlinách, a jejich funkcí je, že pouze propojují jednotlivé neurony navzájem [2].

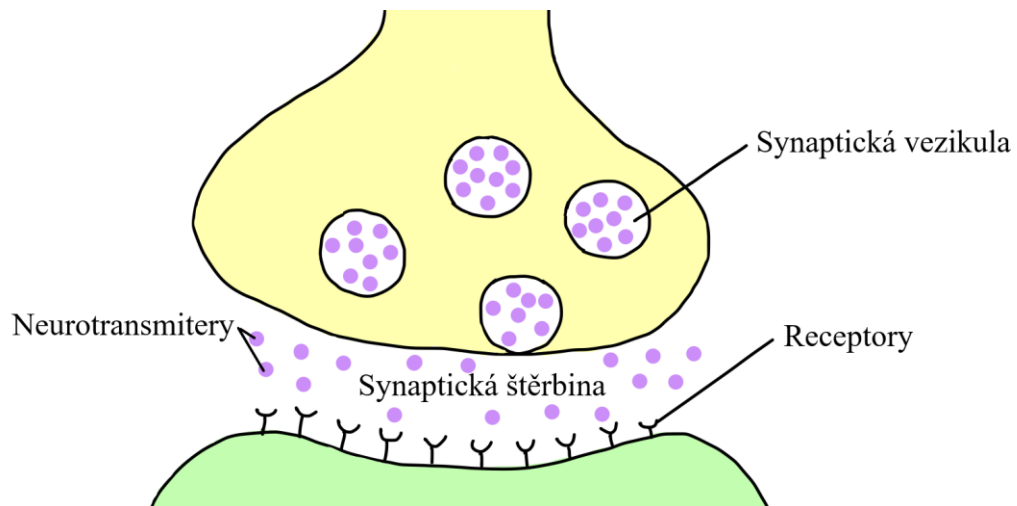
## 2.5 Smrt neuronů

Spousta buněk během života cíleně zaniká. Existují dva různé způsoby smrti, první je řízen aktivací určitých genů, jedná se o fyziologický proces programované smrti buňky – naplánovaná a realizovaná autodestrukce buňky, tento proces nazýváme **apoptóza**. Tímto způsobem často umírají buňky tzv. stářím [2].

Druhý způsob, který zapříčiní zánik buňky, je **nekróza**. Nejvíce k němu dochází vlivem nepříznivého prostředí, působením například chemických, tepelných či mechanických vlivů. V důsledku toho dojde k rozvratu vnitřního prostředí buňky, naruší se plazmatická membrána a dojde k vylití lyzozomálních enzymů a následně ke smrti buňky [2].

## 2.6 Propojení nervových buněk mezi sebou

Přenos nervového signálu probíhá tak, že dojde ke kontaktu mezi dvěma neurony nebo jedním neuronem s běžnou buňkou. Tento přenos probíhá prostřednictvím speciálních zápoju – **synapsí** (obr. 2). Proces zprostředkovaný pomocí synapsí se nazývá neurotransmise, je aktivní, časově omezený a nevratný. Zároveň má v lidském mozku naprosto nepostradatelnou úlohu, narušení synaptické neurotransmise může způsobovat řadu psychiatrických či neurologických poruch [2;6].



Obrázek 2 – Synapse (převzato a upraveno z [5])

### 2.6.1 Rozdělení synapse podle druhu zapojených buněk

1. **Synapse interneuronové** – nejčastější typ, synapse mezi dvěma neurony.

Ty lze dále dělit podle druhu zapojených buněk na [2;6]:

- **synapse axo-dendritické** (nejčastější, dochází u nich k přenosu vzruchu z axonu na dendrit),
- **synapse axo-somatické** (propojení mezi axonem a tělem neuronu),
- **synapse axo-axonální** (pouze velmi vzácné, spojení mezi axonem a axonem),
- **synapse dendro-dendritické** (zřídka pozorovány v hlubokých vrstvách motorické kůry, spojení mezi dvěma dendrity),
- **synapse v průběhu** (axon vytvoří synaptický kontakt a následně pokračuje a vytváří na stejném vlákne další kontakty s jinými buňkami).

2. **Synapse neuroreceptorové** – zprostředkovávají přenos mezi dendritem a senzoricou buňkou, nejčastěji se nachází právě ve smyslových orgánech.
3. **Synapse neuroefektorové** – synapse mezi axonem a efektorovou buňkou.

## **2.6.2 Rozdělení synapse podle druhu přenosu signálu**

Synapse dále můžeme dělit podle toho, jakým způsobem se na nich přenáší signál: rozlišujeme synapse elektrické, chemické a smíšené.

### **1. Elektrické synapse**

Nejsou tak časté jako synapse chemické, cytoplazmy neuronů jsou propojeny prostřednictvím tzv. „gap junctions“, které přímo umožňují přestup iontů a tím také přenos elektrických změn na membráně z jednoho neuronu na druhý. Vyskytují se nejčastěji v interkalárních discích kardiomyocytů a umožňují synchronní kontrakci srdečního svalu. Tato synapse je možná oběma směry, jedná se v podstatě pouze o kanál, kterým procházejí ionty. Obvykle je tento typ synapse excitační [3;7].

### **2. Chemické synapse**

Jsou to téměř všechny zbylé synapse v CNS člověka. Fungují na principu, že první (presynaptický) neuron sekretuje do synaptické štěrbině chemický působek nazývaný neurotransmitter. Tento neurotransmitter je poté zachycen na příslušném receptoru, který se nachází na druhém (postsynaptickém) neuronu. Tato synapse je pouze jednosměrná a může být excitační i inhibiční, podle typu uvolňovaného mediátoru [3;6].

### **3. Smíšené synapse**

Jedná se o kombinaci elektrické a chemické synapse. V případě smíšené synapse se na jedné a téže synapsi uskuteční zároveň chemický i elektrický přenos vzruchu. Tento druh synapse se vyskytuje spíše u nižších obratlovců. [3].

### 2.6.3 Popis synapse

1. **Presynaptický útvar (terminál)** – nejčastěji knoflíkovitě rozšířená koncová část axonu, může to být i specializovaná část sensorické buňky, uvnitř jsou četné synaptické vezikuly (váčky) s neurotransmiterem a na povrchu membrány se nachází presynaptické receptory, které řídí uvolňování mediátorů do synaptické štěrbině.

**Existují dva základní druhy synaptických váček:**

- **velké synaptické váčky** (jinak granulární – denzní) – obsahují především neuropeptidové mediátory, jsou syntetizovány v těle neuronu a následně transportovány do synaptických zakončení,
  - **malé synaptické váčky** – v nich jsou především „klasické“ mediátory neuropeptidové povahy, ty mohou vznikat v těle neuronu, ale také přímo v synaptických zakončeních.
2. **Synaptická štěrbina** – prostor mezi presynaptickým a postsynaptickým útvarem, je široká přibližně 20–50 nm.
  3. **Postsynaptický útvar (terminál)** – obsahuje v plazmatické membráně především receptory, tyto místa poté reagují s molekulami přenašeče [2;3].

## 2.7 Děje v synapsích

Hlavními mediátory synapse jsou neurotransmitery.

### 2.7.1 Neurotransmitery

Neurotransmitery jsou nízkomolekulární látky, které zajišťují přenos vzruchu z jedné nervové buňky na druhou. Tyto neurotransmitery lze dále dělit podle jejich chemické podstaty nebo podle způsobu jakým působí na membránu.

**Dělení neurotransmiterů podle jejich chemické povahy [2;3;6;7]:**

- aminokyseliny (př. glutamát, aspartát, glycin nebo GABA (kyselina  $\gamma$ -aminomáselná)),
- monoaminy (noradrenalin, dopamin, serotonin) a acetylcholin,
- peptidy (vasopresin, somatostatin, neurotensin).

### **Dělení neurotransmiterů podle způsobu, jakým působí na membránu [3]:**

- **ionotropní** – přímo mění propustnost membrány a iontových kanálů:
  - inhibiční (GABA, glycin),
  - excitační (acetylcholin, glutamát),
- **metabotropní** – navázáním na postsynaptickou membránu modulují její reakci na rychlé mediátory, samy vzruch nevyvolají.

#### **2.7.2 Proces uvolňování neurotransmiteru**

V membráně presynaptického útvaru se nachází velké množství  $\text{Ca}^{2+}$  kanálků, vznik akčního potenciálu a jeho následná depolarizace způsobí otevření těchto kanálků a vylití  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do cytoplazmy. Poté dojde k vylití vezikul s neurotransmiterem do synaptické štěrbině, neurotransmitery se naváží na receptory přítomné na postsynaptickém útvaru [2;3;6;7].

### **2.8 Klidový membránový potenciál**

Jedná se o stav buňky, kdy dochází ke vzniku napětí na semipermeabilní buněčné membráně. Mluvíme o rozdílu elektrických potenciálů mezi vnitřkem buňky a jejím okolím. Hodnoty tohoto napětí se pohybují v rozmezí -40 až -90 mV (obecně se ale uvádí hodnota -70 mV). Uvnitř buňky se nachází převážně větší koncentrace  $\text{K}^+$  iontů, zatímco vně buňky je vyšší koncentrace  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  iontů. Toto nerovnoměrné rozložení iontů uvnitř i vně neuronu je zajištěno činností vysoce aktivních transmembránových pump, například sodno-draslíkové pumpy ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpy). Tato pumpa přečerpává  $\text{Na}^+$  ionty ven z neuronu a naopak  $\text{K}^+$  ionty dovnitř do cytoplazmy. Tento stav způsobuje právě ty koncentrační gradienty mezi vnitřkem nervové buňky a jejím okolím. Největší vliv na klidového membránového potenciálu mají především  $\text{K}^+$  ionty, pro ně je totiž za běžných podmínek membrána propustná a mohou skrz ni tedy snadno procházet. Zatímco pro  $\text{Na}^+$  ionty je propustnost membrány téměř nulová [3;6;7].

### **2.9 Místní potenciály a akční potenciál**

Působením mechanického, elektrického nebo chemického podnětu lze vyvolat změnu klidové rovnováhy (tzv. polarizace) na membráně. Vznikají dva typy potenciálů. První je tzv. místní, může to být například potenciál generátorový nebo receptorový. K jeho vzniku dochází při působení podnětu s velmi malou intenzitou, ten způsobí snížení záporného potenciálu o 10–15 mV, tento potenciál se nikam nešíří a zůstává prostorově ohraničen. Druhým typem je akční potenciál, ten lze vyvolat pouze působením dostatečně velkého podnětu minimálně

prahové úrovně, nezůstává prostorově ohraničen, ale z místa svého vzniku se šíří dál po membráně neuronu [3;6;7].

## 2.9.1 Akční potenciál

Vzniká změnou klidového potenciálu na membráně, tuto změnu způsobí šířící se napětí, které následně také mění aktivitu napětěově řízených iontových kanálků. Akční potenciál se řídí zákonem všechno nebo nic. Pokud dojde k působení dostatečně silného podnětu tzv. prahového podnětu, vzniká vzruch [3;6;7].

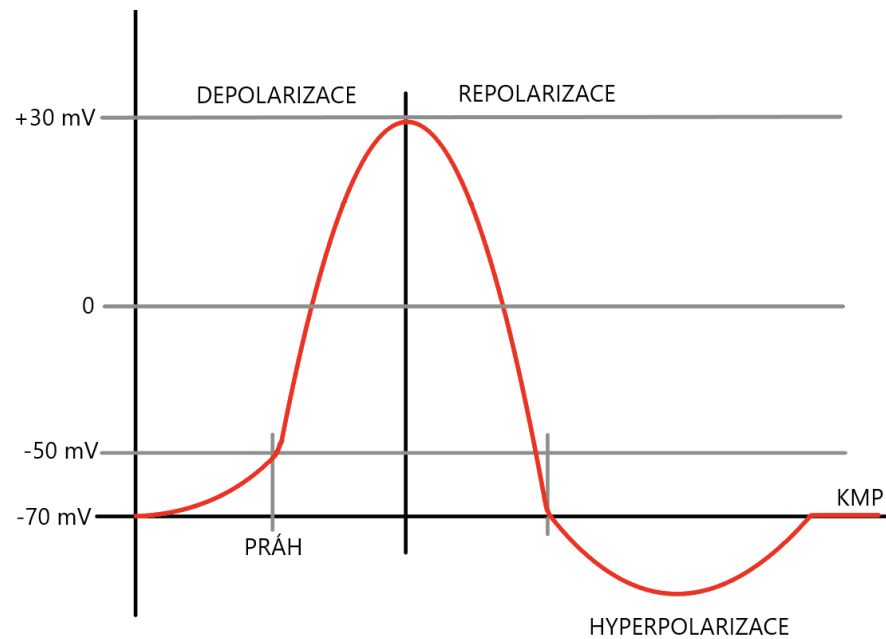
### 2.9.1.1 Fáze akčního potenciálu

Jakmile je vzruch již jednou vyvolán a dojde ke vzniku akčního potenciálu, má vždy totožný průběh, ten znázorňuje graf průběhu akčního potenciálu (obr. 3). Můžeme proto popsat jednotlivé fáze akčního potenciálu:

1. **Klidový membránový potenciál (KMP).**
2. Přichází **depolarizační impuls**, dochází při něm ke snižování záporné hodnoty membránového potenciálu.
3. Hodnota membránového potenciálu dosahuje **prahové hodnoty**. Dochází k otevření napětěově řízených kanálků  $\text{Na}^+$  ionty, ty následně začínají vtékat do buňky.
4. V důsledku nárůstu koncentrace  $\text{Na}^+$  iontů uvnitř buňky dochází k **depolarizaci** membrány. Stále nám klesá záporná hodnota membránového potenciálu, začínáme se dostávat do kladných hodnot.
5. Vzniká **akční potenciál**. Je dosaženo na nejvyšší možnou hodnotu membránového potenciálu (až 30 mV), dochází k přenosu vzruchu.
6. Následně dochází k uzavření  $\text{Na}^+$  kanálků a k otevření  $\text{K}^+$  kanálků,  $\text{K}^+$  ionty vytékají ven z buňky, dochází k **repolarizaci** membrány a membránový potenciál se vrací ke klidové úrovni.
7. Napětěové kanálky pro  $\text{K}^+$  ionty zůstávají otevřené i po dosažení hodnoty klidového membránového potenciálu, to způsobí **hyperpolarizaci** membrány a pokles membránového potenciálu na nižší hodnotu, než je hodnota klidového membránového potenciálu.



8. Napětově řízené kanálky pro  $K^+$  ionty jsou uzavřeny,  $K^+$  ionty se vrací zpátky do buňky otevřenými (tzv. „leak“) kanálky. Potenciál se vrací na hodnotu klidového membránového potenciálu [3;6;7].



Obrázek 3 – Graf průběhu akčního potenciálu (převzato a upraveno z [8])

## 2.10 Vazba na receptory

Po proběhnutí akčního potenciálu dojde k navázání neurotransmiterů na receptory na postsynaptické membráně. Může dojít buď ke zvýšení aktivity postsynaptického neuronu tzv. **excitaci** nebo ke snížení aktivity tzv. **inhibici** [2;3;6;7].

### 2.10.1 Excitační postsynaptický potenciál

Aby vznikl excitační postsynaptický potenciál (EPSP), tak nejprve dochází k excitaci. Ta způsobí otevření  $\text{Na}^+$  kanálků,  $\text{Na}^+$  ionty se přesouvají do cytoplazmy buňky a způsobí depolarizaci postsynaptické membrány, poté dochází ke vzniku EPSP [2;3;6;7].

### 2.10.2 Inhibiční postsynaptický potenciál

Inhibiční postsynaptický potenciál (IPSP) je nejčastěji způsoben otevřením  $\text{Cl}^-$  kanálků, vzácněji i  $\text{K}^+$  kanálků.  $\text{Cl}^-$  ionty pronikají do cytoplazmy buňky,  $\text{K}^+$  ionty vytékají ven z buňky. To způsobí hyperpolarizaci postsynaptické membrány a IPSP, dojde k oddálení od prahu a zastavení signálu [2;3;6;7].

Jeden EPSP obvykle nestačí, aby bylo dosaženo prahové hodnoty pro vznik akčního potenciálu a aby mohly být otevřeny kanálky. Excitační potenciály se proto sčítají, musí jich proběhnout hned několik, aby vznikl akční potenciál. Pokud naopak probíhá IPSP, dochází k součtu signálů a inhibiční signál snižuje excitační, oddaluje se hodnota prahu a nedochází ke vzniku akčního potenciálu [2;3;6;7].

## 2.11 Odstranění mediátoru

Existují dvě nejčastější možnosti odstranění mediátoru ze synaptické štěrbiny, prvním je **přímý (enzymatický) rozklad**, kdy je mediátor rozložen příslušnými enzymy. Druhou možností je potom **zpětné vyčytávání**, mediátor se vrací zpět do presynaptického zakončení a je možné ho znovu využít [2].

## 3 NEUROTOXICKÉ LÁTKY

Existuje množství neurotoxických látek, které se vzájemně liší především tím, na jaké úrovni v těle působí [1;9;10].

### 3.1 Neurotoxické látky přímo poškozující neurony

Některé neurotoxické látky vstupují do těla s cílem poškodit části neuronu či neuron přímo zabít. Poškození, byť jen axonu či myelinové tkáně, může mít za následek narušení celé schopnosti neuronu přenášet nervový vzruch. Neurony se během lidského života nedělí a ani nedochází k jejich úplné regeneraci, čím je tedy člověk starší, tím jeho počet neuronů klesá. Tento deficit tělo vynahrazuje vzrůstajícím počtem nervových spojení, jednotlivé části neuronu, například dendrity, mají schopnost růst a větvit se, a to následně přispívá ke zvýšení počtu spojení. Funkce nervového systému není tedy na množství živých neuronů kriticky závislá [1;9;10].

Mezi látky přímo poškozující neurony řadíme [1;9;10]:

- kovy (např. arsen, lithium, olovo, rtuť),
- organická rozpouštědla (např. hexan, 2-hexanon, sirouhlík, methanol),
- organokovové sloučeniny cínu a rtuti,
- léčiva (chloramfenikol, streptomycin, aminoglykosidová antibiotika, nitrofurantoin),
- pesticidy (např. pyrethroidy).

Pro správnou funkci nervové soustavy a přenos nervového vzruchu je také důležité dostatečné množství živin a kyslíku. Aby přísun živin a kyslíku do celého těla nemohl být narušen, chrání se mozek před toxickými látkami hematoencefalickou bariérou. Tato bariéra ale tvoří pouze určitou ochrannou přepážku a existují toxické látky, které ji dokáží narušit [1;9;10].

### 3.2 Neurotoxické látky ovlivňující přenos nervových vzruchů

V tomto případě vstupují do těla neurotoxické látky za účelem narušení správného přenosu nervového vzruchu. Ten mohou ovlivnit několika způsoby, jedním z nich je například, že se dokáží navázat na stejný receptor jako neurotransmitter a pak mohou nastat dva případy:

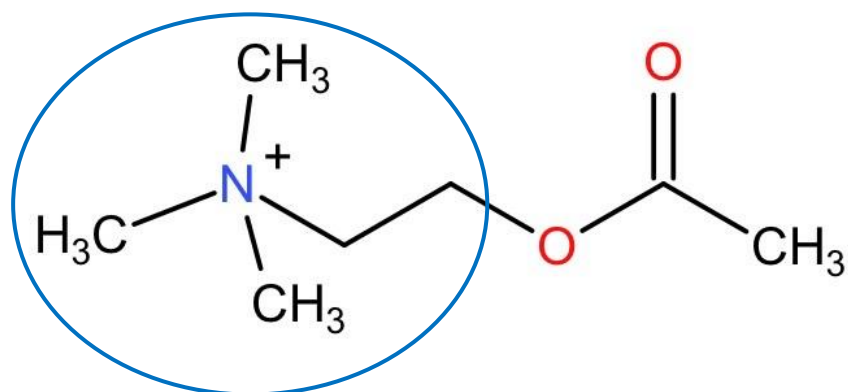
- **antagonisté** – látka blokuje receptor, ten nemůže být aktivován neurotransmiterem a zabrání tím přenosu nervového vzruchu,
- **agonisté** – látka receptor aktivuje a dojde k přenosu vzruchu, stejně jako by to udělal neurotransmitter, tento stav ale nemusí být vždy žádoucí.

Aby mohla látka nějakým způsobem interagovat s receptorem pro příslušný neurotransmitter, musí s ním mít určitou strukturní podobnost, ta je zde u jednotlivých sloučenin zvýrazněna modrou elipsou [1;9;10].

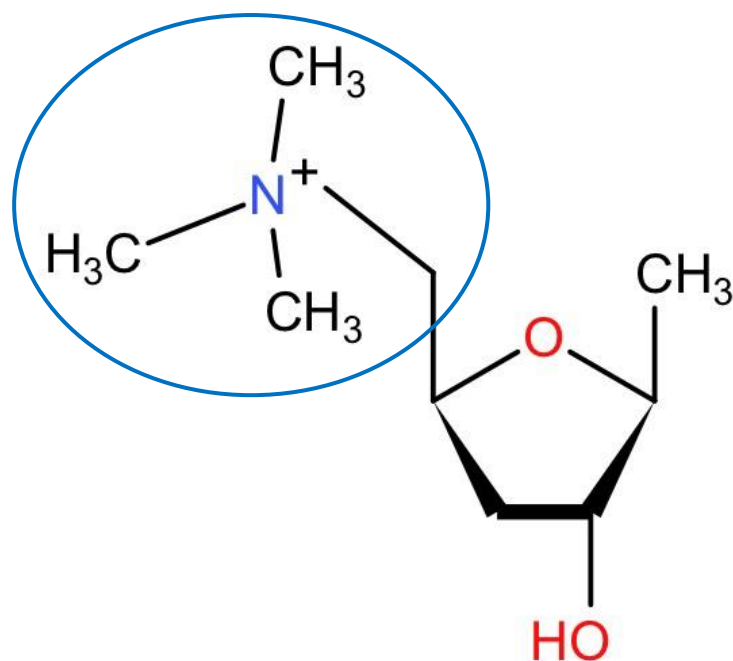
Jako příklad je uveden v těle nejrozšířenější neurotransmitter – **acetylcholin** (strukturní vzorec znázorněn na obr. 4).

**Agonisté acetylcholinu** – muskarin, nikotin (strukturní vzorce znázorněny na obr. 5 a 6).

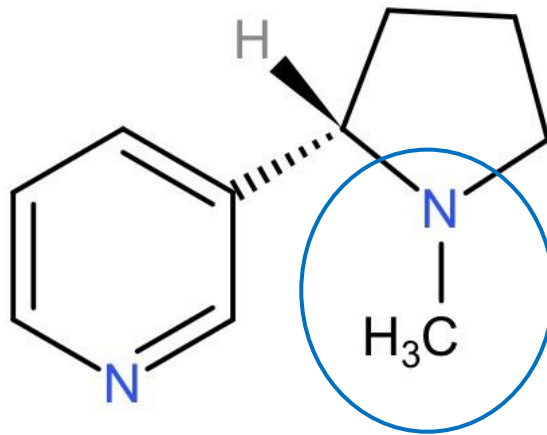
**Antagonista acetylcholinu** – tubokurarin (strukturní vzorec znázorněn na obr. 7).



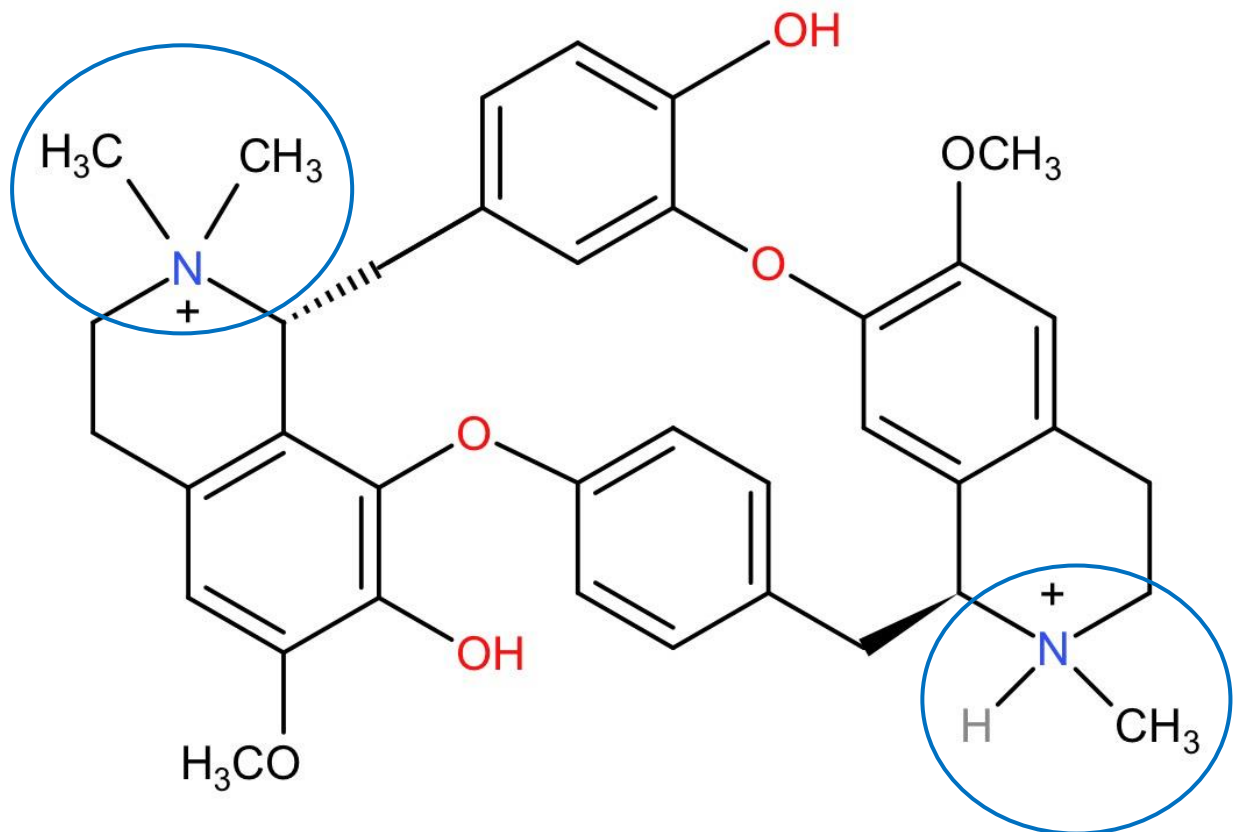
Obrázek 4 – Strukturní vzorec acetylcholinu (převzato a upraveno z [1])



Obrázek 5 – Strukturní vzorec muskarinu (převzato a upraveno z [1])



Obrázek 6 – Strukturní vzorec nikotinu (převzato a upraveno z [1])



Obrázek 7 – Strukturní vzorec tubokurarínu (převzato a upraveno z [1])

Podle těchto agonistů rozlišujeme dva druhy cholinergních receptorů: muskarinové a nikotinové.

Dalšími způsoby, kterými toxické látky narušují vznik nervového vzruchu, může být například ovlivnění transportu iontů membránami neuronů, inhibice rozkladu neurotransmiterů nebo naopak jejich předčasný rozpad, či ovlivnění jejich uvolňování z vesikulů v nervových zakončeních nebo vychytávání ze synaptické štěrbin. Dále lze také činnost neuronů ovlivnit i změnami koncentrací iontů  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  v krvi [1;9;10].

**Mezi látky ovlivňující přenos nervového vzruchu řadíme [1;9;10]:**

- látky inhibující uvolňování neurotransmiteru do synaptické štěrbin (např. botulotoxin),
- látky inhibující zpětné vychytávání neurotransmiteru (např. antidepresiva, kokain),
- látky inhibující enzym acetylcholinesterázu (karbamáty (např. fysostigmin) a organofosfáty, což jsou nejčastější neurotoxické paralytické bojové látky (např. sarin, soman, VX nebo tabun),
- látky narušující transport iontů membránami (např. tetrodotoxin, akonitin),
- látky působící jako antagonisté neurotransmiterů na postsynaptických receptorech (např. atropin, hyoscin, hyoscyamin, strychnin).

### **3.3 Neurotoxické látky návykové**

Jedná se o látky omamné a psychoaktivní, které při opakovaném působení vyvolávají návyk a závislost. Některé návykové látky působí tlumivě a narkoticky a některé naopak způsobují pocity radosti a euforie.

**Mezi látky návykové patří [1;9;10]:**

- ethanol,
- nikotin,
- kofein,
- opiáty (např. morfin, heroin, kodein),
- kanabinoidy (např. hašiš, marihuana),
- halucinogeny (např. LSD).

## 4 NEUROTOXICKÉ LÁTKY POCHÁZEJÍCÍ Z ŽIVOČICHŮ

### 4.1 PAVOUČÍ JEDY

Pavoučí jedy obecně obsahují velké množství peptidových toxinů, které se zaměřují na ovlivnění aktivity různých napěťově řízených iontových kanálků neuronů. Některé z nich, jako například jingzhaotoxin (JZTx), mohou blokovat napěťově řízené sodíkové kanály uzavřením pórů kanálu a blokováním toku iontů, jiné, například hanatoxin (HaTx), fungují na principu modifikace hradlování. Stanovení struktur, funkce a toxinové specifity těchto toxinů je zásadní pro vývoj léčiv zaměřených proti nemocem souvisejícím s iontovými kanály [11;12].

#### 4.1.1 Hanatoxin

Hanatoxin (HaTx) je protein pocházející z jedů pavouků, pro vědecké účely se získává například ze sklípkana růžového (*Grammostola spatulata*), kterému se přezdívá také Tarantola rosa cilena, v překladu tedy Chilská růžová tarantule. Tento neurotoxin způsobuje silnou inhibici  $K^+$  kanálků narušením normální činnosti napěťově závislého hradlového mechanismu [11;13].

#### 4.1.2 Omega-grammotoxin SIA

Dalším neurotoxickým proteinem pocházejícím z jedu sklípkana růžového je  $\omega$ -grammotoxin SIA. Tento toxin působí jako blokátor napěťově řízených kanálků pro  $Ca^{2+}$ . Stejně jako u HaTx toxin inhibuje své příslušné kanály tím, že narušuje činnost napěťově závislého hradlového mechanismu [11;14].

#### 4.1.3 SGTx1

Jedná se o první toxin získaný z jedu pavouka *Scodra griseipes*. SGTx1 protein je svým chováním i strukturou podobný již zmiňovanému HaTx [15].

#### 4.1.4 Jingzhaotoxin

Z jedu čínského sklípkana *Chilobrachys jingzhao* byl získán toxin nazývaný jingzhaotoxin (JZTx), stejně jako u ostatních pavoučích toxinů se jedná o protein kódovaný sekvencí AMK. Tento toxin funguje na principu, že inhibuje proud a zpomaluje inaktivaci  $Na^+$  kanálů posunutím hranice napěťové aktivace na depolarizovanější potenciály na neuronech, a tím se zásadně liší od klasických toxinů, které posouvají hranici napěťové aktivace opačným směrem [16].

#### **4.1.5 Hainantoxin**

Hainantoxin (HNTx) je toxin izolovaný z jedu čínského ptačího pavouka *Seleconosmia hainana*. Tyto neurotoxické peptidy působí podobným způsobem jako JZTx, a to snížením rychlosti obnovy inaktivace Na<sup>+</sup> kanálků [17].

#### **4.1.6 Analýza a izolace pavoučích toxinů**

Většina těchto neurotoxinů byla izolována z jedů odebraných přímo z pavouků. Nejčastěji se pro izolaci proteinu používala různými způsoby upravená metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), například u ω-grammotoxinu byl jed z pavouka izolován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC). SGTx1 toxin byl izolován s využitím gelové filtrace a již zmíněné RP-HPLC. Jed pavouka obsahujícího JZTx byl zase nejprve frakcionován pomocí iontově výměnné HPLC a následně purifikována pomocí stejné metody RP-HPLC jako u předchozích toxinů [12;14;15].



## 4.2 ŠTÍŘÍ JEDY

Štíři jsou jednou z nejstarších skupin suchozemských zvířat, vyvinuli si svůj jedový systém jako primární zbraň pro zachycení kořisti a také ochranu před predátory. Obsahují širokou skupinu toxinů, kteří působí nejčastěji jako modulátoři Na<sup>+</sup> a blokátoři K<sup>+</sup> kanálků. Stejně jako u pavouků, většinu toxinů tvoří proteiny [18].

### 4.2.1 Kurtoxin

Toxin izolovaný z jedu *Parabuthus granulatus*, který způsobuje inhibici Na<sup>+</sup> kanálku [19].

### 4.2.2 Birtoxin a ikitoxin

Oba tyto toxiny byly izolovány ze štíra transvaalského (*Parabuthus transvaalicus*), působí na Na<sup>+</sup> napěťové kanálky, a to tím způsobem, že posunují napěťové závislosti aktivace na zápornější membránové potenciály [19].

### 4.2.3 Charybdotoxin

Charybdotoxin (CHTx) je toxin, který byl izolován z jedu štíra nejjedovatějšího (*Leiurus quinquestriatus* var. *Hebraeus*). Je prvním identifikovaným peptidovým inhibitorem pro vysokovodivý Ca<sup>2+</sup> a napěťově závislý K<sup>+</sup> kanál [20;21].

### 4.2.4 Kaliotoxin a agitoxin

Oba tyto štíří jedy, kaliotoxin (KTx) a agitoxin (AGTx), jsou specifickými blokátory K<sup>+</sup> kanálu aktivovaným Ca<sup>2+</sup>, KTx toxin byl izolován z jedu štíra tlustorepého (*Androctonus australis*) [22].

### 4.2.5 Analýza a izolace štířích jedů

Purifikace a charakterizování těchto jedů často probíhá velmi obdobně jako u pavouků, nejčastěji se využívá analýza RP-HPLC ve spojení s elektrosprejovou hmotnostní spektrometrií (ESI-MS) [22].

## 4.3 JEDY HADŮ

Existuje velké množství hadích toxinů, většina z nich jsou stejně jako u předchozích skupin neurotoxicke proteiny. Liší se způsoby, jakými ovlivňují funkci nervového systému. V této skupině jedů se nachází i toxiny s afinitou k muskarinovým či nikotinovým receptorům nebo jedy způsobující inhibici acetylcholinesterázy [23].

### 4.3.1 Dendrotoxin

Dendrotoxin (DTX) je toxin pocházející z jedu mamby černé (*Dendroaspis polylepis*), tento protein se váže na  $K^+$  napěťové kanálky a následně je blokuje [24;25].

### 4.3.2 Kobrotoxin

Je to jeden z nejsmrtelnějších neurotoxinů, tento toxin byl izolovaný z kobry čínské (*Naja naja atra*), přezdívané také jako taiwanská kobra. Váže se na nikotinové acetylcholinové receptory na postsynaptické membráně a blokuje tak přenos nervového vzruchu [26].

### 4.3.3 Fasciculin

Jedná se o skupinu toxinů izolovaných z jedů mamby černé (*Dendroaspis polylepis*) nebo mamby zelené (*Dendroaspis viridis*). Tyto peptidy mají velmi silnou inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesteráze [27].

### 4.3.4 Analýza hadích jedů

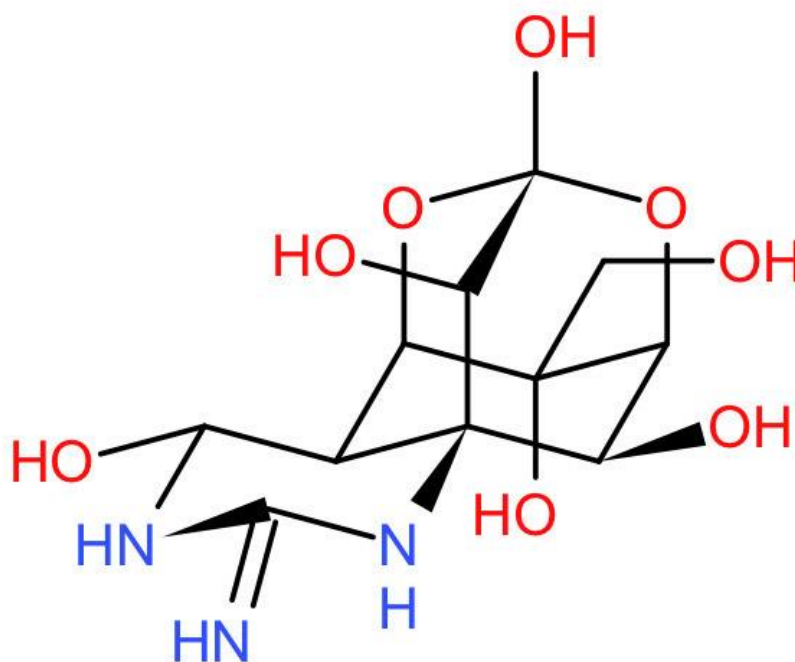
Toxiny hadích jedů se purifikují velmi podobně jako předchozí toxiny, při analýze DTX se často využívá například metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie a kapilární zónové elektroforézy. Kobrotoxin lze analyzovat metodou HPLC a gelovou elektroforézou [24;28].

## 4.4 JEDY MOŘSKÝCH ŽIVOČICHŮ

### 4.4.1 Tetrodotoxin

Tetrodotoxin (TTX) je neurotoxin, který se vyskytuje primárně u čtverzubců a u dalších mořských živočichů. Strukturní vzorec TTX je znázorněn na obrázku 8. Tento toxin je převážně izolován z kůže, útroh, vaječníků a jater čtverzubcovitých, anglicky známých pod názvem „Puffer fish“, česky překládaným jako ryba fugu. Přezdívá se jim takto proto, že v případě, kdy jim hrozí nebezpečí, se umí nafouknout jako míč. Tetrodotoxin je produkován různými druhy bakterií, zvířata nesoucí TTX ho mohou absorbovat a následně dále šířit prostřednictvím potravního řetězce. Zároveň je ale TTX široce používán v mnoha laboratořích jako důležité farmakologické činidlo, kvůli své schopnosti selektivně blokovat sodíkové kanály na nervové membráně. TTX funguje jako velmi silný jed, momentálně ale pro něj neexistuje žádný protijed, působí postupné ochrnutí svalstva, oběť otravy se často udusí při plném vědomí. Základem léčby je tedy pečlivé pozorování a sériové neurologické vyšetření za účelem sledování progresu klinických účinků, aby bylo možné adekvátně léčit respirační selhání nebo nebezpečné účinky na srdce.

Poprvé byl TTX izolován z toxické ryby fugu v roce 1950 ve formě krystalického hranolu. Jeho struktura byla poté objasněna o několik let později několika skupinami vědců [29;30].



Obrázek 8 – Strukturní vzorec tetrodotoxinu (převzato a upraveno z [31])

Smrtelná dávka je 5 000 až 6 000 MU/mg [1 MU (myší jednotka), je definována jako množství toxinu potřebné k usmrcení 20g myšičky během 30 minut po intraperitoneálním podání] a minimální letální dávka (MLD) u lidí se odhaduje přibližně na 10 000 MU (což odpovídá cca 2 mg TTX). Mimo samotný TTX se v rybě fugu či jiných organismech nesoucích TTX často nachází i některé jeho deriváty [30].

Už před mnoha lety se vědělo, že TTX se vyskytuje výhradně v rybě fugu, ale nevědělo se, zdali je TTX v rybách endogenní (tzn. produkováný samotnou rybou) nebo exogenní (přijatý zvenčí a akumulovaný). Následně bylo provedeno několik výzkumů a bylo zjištěno, že ryby fugu se stávají netoxické, pokud jsou uměle chovány a krmeny netoxickou stravou. Tyto netoxické ryby se tedy stávají toxickými, když jsou krmeny stravou obsahující právě TTX. Takto bylo objasněno, že hlavním mechanismem akumulace v rybě fugu je právě potravní řetězec, ten se skládá z několika kroků, ale primárním zdrojem TTX v něm jsou mořské bakterie [30].

#### **4.4.1.1 Distribuce a akumulace TTX v Pufferfish**

V současné době je uvedeno přibližně 22 druhů jako ryb nesoucích TTX, všechny tyto ryby patří do čeledi čtverzubcovití (*Tetraodontidae*), ale jejich distribuce TTX v těle je velmi specifická. U mořských druhů mají obecně nejvyšší toxicitu játra a vaječníky, následně také střeva a kůže. Svaly a varlata jsou netoxické nebo jen velmi slabě toxické, jsou pak považovány za jedlé, a to i u mnoha toxických druhů. U druhů, které nejraději obývají pobřežní či brakické vody a sladkovodní vody, je nejtoxičtější orgánem kůže [30].

#### **4.4.1.2 Analytické metody detekce otravy tetrodotoxinem**

Pro zjištění otravy člověka a následné stanovení množství TTX jsou využívány různé možnosti odběru vzorku. Je možné odebírat vzorek přímo z kontaminované ryby, která byla otráveným člověkem požitá, nebo provést odběr biologického materiálu přímo z otráveného pacienta, následně je nutné pro každý vzorek vybrat vhodný druh analýzy [32;33;34].

## **Analýza otrávených ryb s využitím kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí**

Byly odebrány vzorky ryb goby, které byly předtím konzumovány našimi pacienty. Ti se touto rybou otrávil a následně u nich byla detekována hladina TTX pomocí metody kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS).

Odebrané vzorky pocházely ze svalů a vnitřností ryb goby, pro následnou analýzu byl odebrán pouze 1 g z každého druhu kontaminované ryby. Tento vzorek byl následně homogenizován, smíchán s 1% roztokem kyseliny octové v methanolu, vytřepán a smíchán s dalším množstvím 1% kyseliny octové. Po následné extrakci ultrazvukem byl extrahovaný roztok smíchán s acetonitrilem a centrifugován. Odebraný supernatant byl použit pro analýzu.

Výsledkem analýzy byla potvrzena přítomnost TTX a pomocí LC-MS/MS bylo zjištěno, že v rybách zůstalo ještě 2090,12 µg/kg TTX.

Ačkoliv v krvi pacientů se již nenacházelo žádné množství TTX, na základně symptomů (závratě, nevolnosti, zvracení, znečlivění jazyka a slabosti končetin) a také analýze vzorků požitých ryb goby, lze potvrdit, že se jednalo o otravu TTX. Pacienti nezkonzumovali dostatečně velké množství otrávených ryb, aby pro ně otrava TTX byla ohrožující na životě [32].

### **Analýza vzorků lidského séra a krve s využitím kapalinové chromatografie**

Byla vyvinuta také citlivá analytická metoda pro stanovení TTX v lidské posmrtné krvi. Využívalo se zde hydrofilní interakční kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektroskopií [33].

Ve vzorcích byly nejprve vysráženy proteiny methanolem, následně vyčištěny s využitím katexu metodou extrakce tuhou fází (SPE) a následovala separace na koloně s vázaným fosforylcholinem pro separaci kapalinovou chromatografií hydrofilních interakcí (PC-HILIC) s využitím izokratické eluce (1% kyselina octová a acetonitril). Pro identifikaci TTX byla použita hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací [33].

Byly odebrány vzorky dvou pacientů a jedné oběti, kteří konzumovali rybí polévku a následně byli v nemocnici přijati a léčeni s příznaky podobnými otravě TTX. Tyto vzorky byly zpracovány výše popsanou metodou a byla v nich detekována přítomnost TTX v následujícím množství – viz tabulka č. 1. Pacient č. 1 zemřel ještě před příjezdem do nemocnice [33].

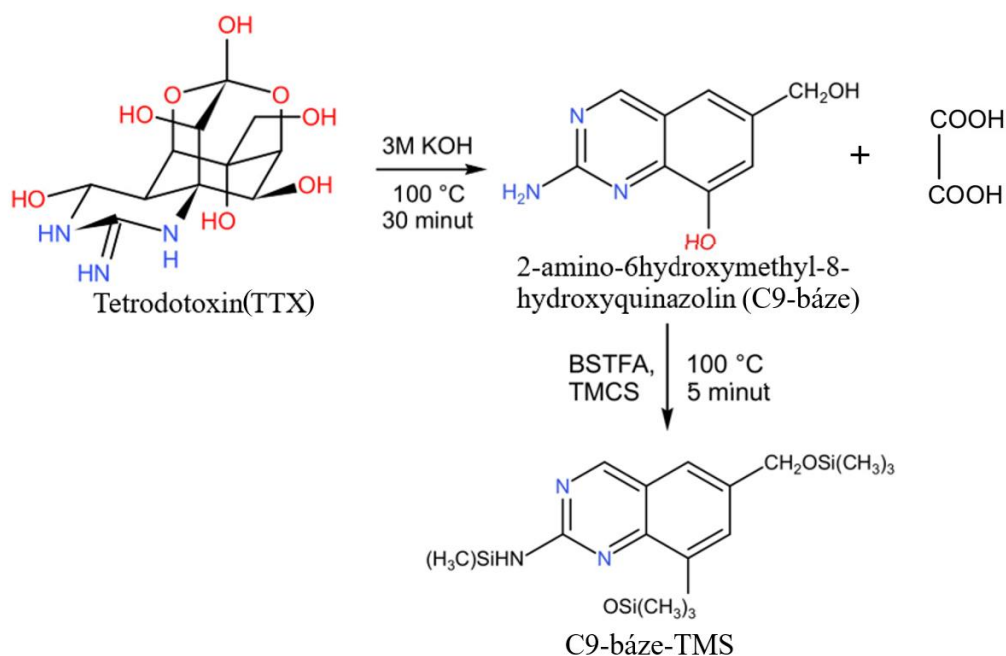
**Tabulka 1 – Výsledky analýzy vzorků krve a séra tří pacientů [33]:**

Pacient	Pohlaví/věk	Zjištěná hladina (ng/ml)		
		Srdeční krev	Periferní krev	Sérum
1	muž/47	27,2	30,0	29,7
2	muž/48	-	12,1	12,8
3	muž/46	-	3,1	3,9

### **Analýza vzorků TTX v lidské plazmě metodou plynové chromatografie**

V tomto měření byla využita metoda plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s monitorováním vybraných iontů (GC/MS-SIM). Vzorky plazmy musely být nejprve připraveny k analýze pomocí extrakce tuhou fází. Nádobky pro filtraci byly nejprve naplněny methanolem a destilovanou vodou, k plazmě byla přidána směs kyseliny octové a methanolu v poměru (3:97). Směs byla nejprve 15 minut zahřívána ve vodní lázni a následně centrifugována po dobu 15 minut. Směs byla následně promyta na koloně a eluát byl zachycen do zkumavky. Následně byl tento roztok odpařen za sníženého tlaku, opět rozpuštěn v kyselině octové smísené s chloroformem pro odstranění lipidů a poté opět 15 minut centrifugován. Tento proces se znovu opakoval pro získání veškerého TTX do eluátu.

Pro GC analýzu bylo nutné provést konverzi TTX na C9-bázi-TMS (Trimethylsilyl derivát 2-Amino-6-hydroxymethyl-8-hydroxychinazolinu). Tato reakce proběhla podle schématu uvedeného na obrázku 9 [34].



Obrázek 9 – Schéma konverze TTX na C9-bázi-TMS (převzato a upraveno z [34])

Získaný plazmatický extrakt byl následně rozpuštěn v KOH a zahříván, po ochlazení muselo být ještě upraveno pH pomocí HCl na hodnotu 9. Roztok byl následně aplikován na zásobník a promyt methanolem a destilovanou vodou. Poté co byla C9-báze eluována směsí kyselina octová-methanol, byla odpařena za sníženého tlaku. Vysušený zbytek byl rozpuštěn ve směsi kyselina octová-methanol a smíchan s malým množstvím *n*-oktacosanu rozpuštěném v pyridinu. Směs byla opět odpařena do sucha, rozpuštěna v TMCS v BSTFA a zahřáta. Po ochlazení směs mohla být analyzována na GC/MS-SIM. Tato metoda je doporučena pro využití v klinické a forenzní toxikologii kvůli své vysoké citlivosti a spolehlivosti. Obecně je ale méně vhodná pro využití z důvodu složitého extrakčního postupu a časové náročnosti přípravy vzorku [33;34].

### **Analýza vzorků TTX v moči otrávených pacientů pomocí imunoafinitní chromatografie**

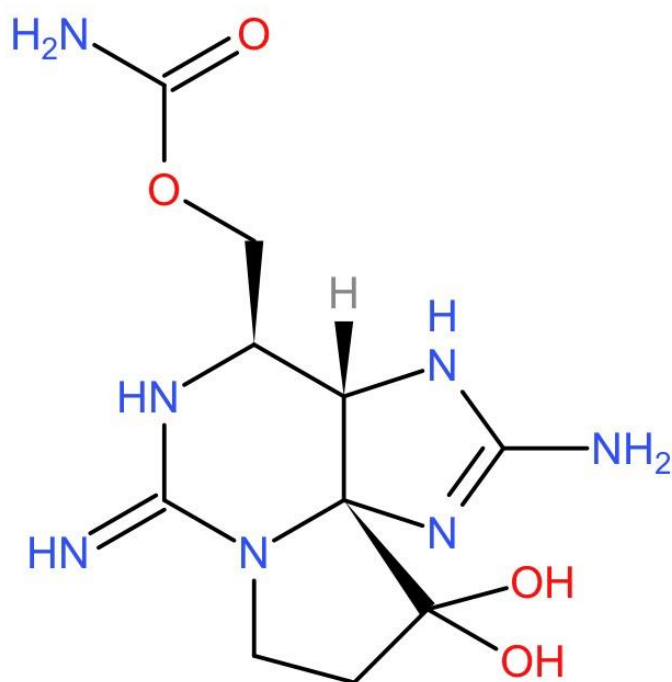
V imunoafinitní chromatografii se využívá monoklonální protilátka (TI-I), která je specifická pro TTX a byla speciálně vyvinuta pro izolaci TTX z moči. Kombinací této vyvinuté imunoafinitní chromatografie s následnou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí, je možné stanovit TTX ve vzorcích moči. Pomocí těchto metod byl ve všech vzorcích moči, které byly odebrány otráveným pacientům během týdne po požití otrávených ryb, detekován TTX, mez detekce TTX v moči byla 2 ng/ml. Tento způsob analýzy TTX je však velmi drahý vzhledem k ceně monoklonální protilátky proti TTX [33;35].



#### 4.4.2 Saxitoxin

Saxitoxin (STX) je neurotoxin, který se vyskytuje primárně u měkkýšů, a je spojen s paralytickou otravou po konzumaci měkkýšů. Strukturální vzorec STX je znázorněn na obrázku 10. Existuje asi 57 jeho analogů a společně patří do skupiny paralytických korýšovitých toxinů (PST). Původci těchto toxinů jsou nejčastěji mořské obrněnky a sladkovodní sinice, ty tvoří rozsáhlé květy po celém světě a způsobují paralytické otravy měkkýšů (PSP). Toto onemocnění je způsobeno navázáním PST na napěťově řízené Na<sup>+</sup> kanálky. V současné době neexistuje žádný protijed zabraňující této otravě [36;37].

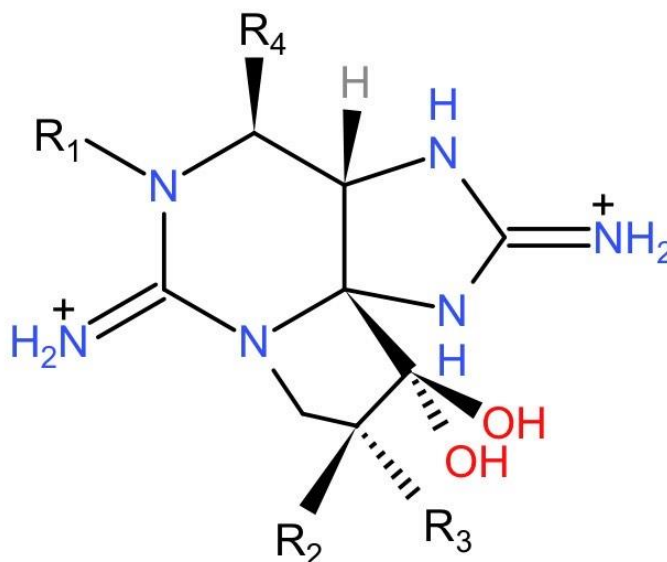
Saxitoxin je jedním z nejučinnějších známých přírodních toxinů, smrtelná dávka pro člověka je cca 1 mg tohoto toxinu zkonsumovaného z jedné porce kontaminovaných měkkýšů. STX byl poprvé v čisté formě izolován z aljašské škeble máslové (*Saxidomus gigangteus*) v roce 1957, je zároveň také prvním identifikovaným PST. Vzhledem k jeho vysoce polární charakteristice ho ale bylo velmi obtížné krystalizovat, proto byla jeho samotná struktura objasněna až v roce 1975 [36;37].



Obrázek 10 – Strukturální vzorec saxitoxinu (převzato a upraveno z [38])

#### 4.4.2.1 Analogy STX

Všechny analogy STX patří pod PST a sdílejí **tetrahydropurinový kruh**, který může být substituován v různých polohách. Strukturální vzorec různých možností analogů STX je znázorněn na obrázku 11.



Obrázek 11 – Obecný strukturální vzorec analogů saxitoxinu (převzato a upraveno z [39])

Analogy STX jsou klasifikovány podle postranního řetěze R<sub>4</sub>, který tvoří hlavní toxinové skupiny. Mezi ty nejvíce toxické patří karbamoyl, dekarbamoyl a *N*-sulfokarbamoyl. Existují ještě další substituenty PST, ale toxicita byla stanovena pouze u části z nich [37,38,39].

- **Karbamoyl** (strukturální vzorec znázorněn na obr. 12),

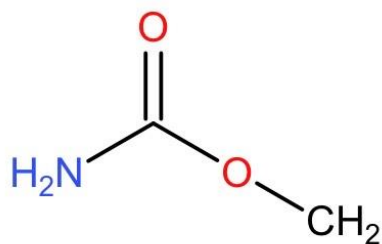
do této skupiny patří saxitoxin (STX), neosaxitoxin (NeoSTX) a gonyautoxiny (GTX1-4).

- ***N*-sulfokarbamoyl** (strukturální vzorec znázorněn na obr. 13),

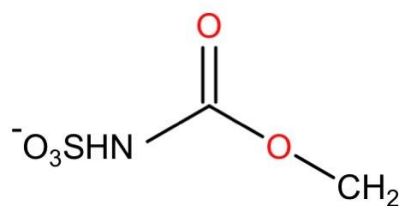
do této skupiny zařazujeme zbylé gonyautoxiny (GTX 5-6) a také C1-4 analogy.

- **Decarbamoyl** (strukturální vzorec znázorněn na obr. 14),

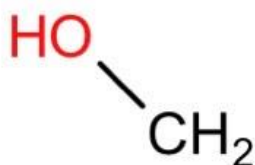
do této skupiny spadají dekarbamoylsaxitoxin (dc-STX), dekarbamoylneosaxitoxin (dc-NeoSTX) a dekarbamoylgonyautoxin (dc-GTX1-4).



Obrázek 12 – Strukturní vzorec karbamoylu (převzato a upraveno z [39])

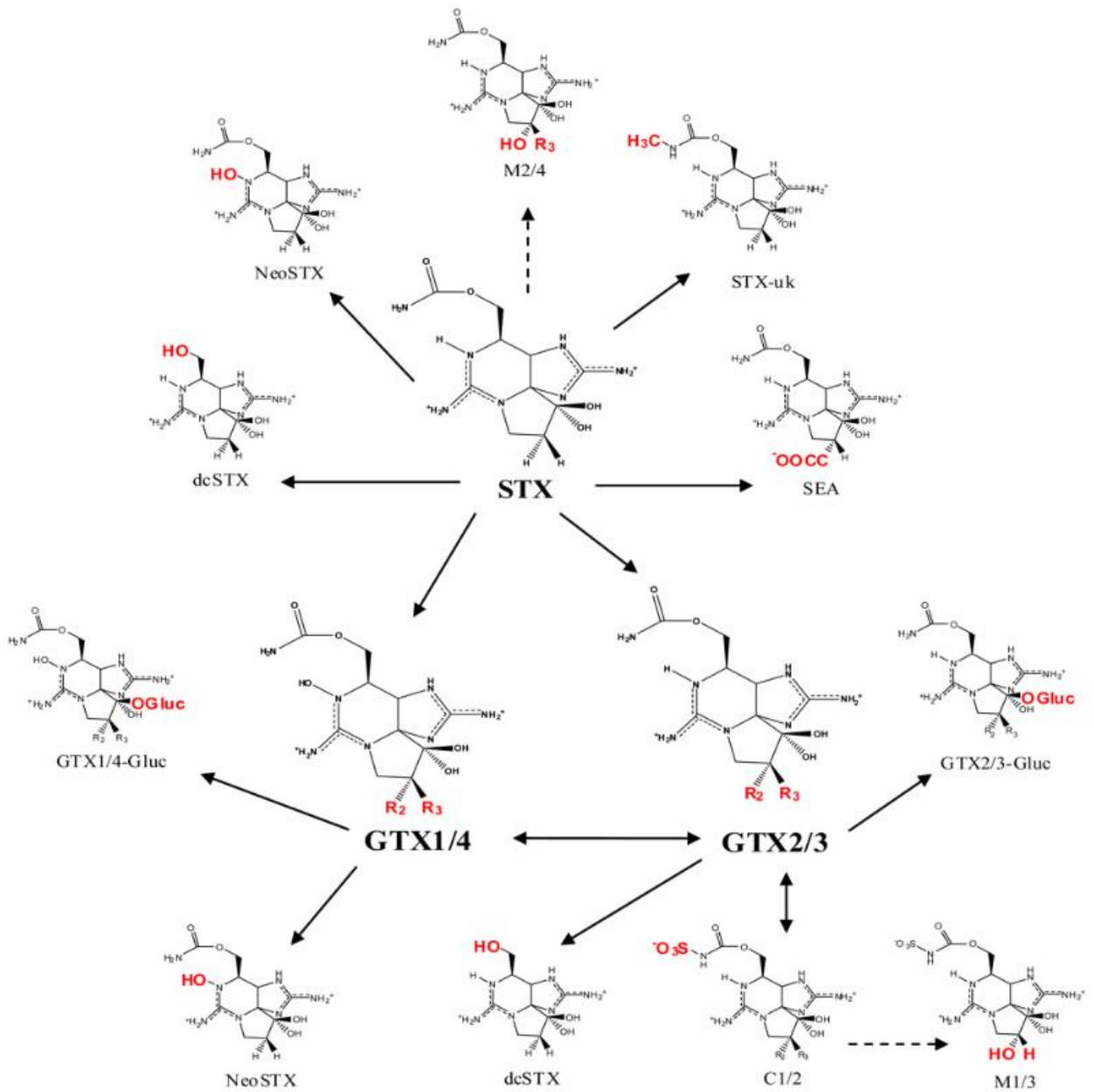


Obrázek 13 – Strukturní vzorec *N*-sulfokarbamoylu (převzato a upraveno z [39])



Obrázek 14 – Strukturní vzorec dekarbamoylu (převzato a upraveno z [39])

Strukturální vzorce všech nejčastějších analogů STX a GTX najdeme na obrázku 15.



Obrázek 15 – Strukturální vzorce analogů saxitoxinu a gonyautoxinu  
(převzato a upraveno z [36])

kyselina 11-saxitoxinethanová (SEA), karbamoyl-N-methylsaxitoxin (STX-uk),  
gonyautoxin(1-4)-glukuronid (GTX(1-4)-Gluc)

#### **4.4.2.2 Metody detekce otravy saxitoxinem**

Pro analýzu STX a jeho analogů se nejčastěji využívá metody biotestu na myši (MBA). Alternativní možností je detekce STX s využitím metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD) nebo imunoanalýz [40;41;42;43].

##### **Detekce biotestem na myši (mouse bioassay)**

Nejprve se homogenizovaná tkáň měkkýšů povaří v 0,1 M HCl, poté se upraví pH na hodnotu 3 a vzorky se odstředí nebo přefiltrují přes papírový filtr. Tento kyselý extrakt se naočkuje do pobřišnice myši, u které se následně snažíme zjistit dávku, která u myši vyvolá smrt již po 1 hodině od podání této injekce z extraktu měkkýšů [40;41].

##### **HPLC analýza vzorků měkkýšů**

Vzorky měkkýšů byly nejprve homogenizovány a následně extrahovány 1% kyselinou octovou. Tyto extrakty byly poté vyčištěny na SPE kolonce. Přečištěné extrakty byly derivatizovány periodátovými a peroxidovými oxidanty a takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí HPLC-FLD [40].

##### **Imunoanalýza STX**

Pro analýzu STX a dc-STX ve vzorcích měkkýšů se dá také využít relativně jednoduchého a citlivého imunotestu (IA) na základě využití kapilární elektroforézy s elektrochemickou detekční metodou (CEIA-EC). Tato metoda je založena na kompetitivních reakcích mezi antigenem značeným křenovou peroxidázou (HRP) ( $Ag^*$ ) a volným antigenem ( $Ag$ ) s omezeným množstvím protilátky. Po inkubaci vzniká navázaný komplex značený enzymem ( $Ag^*-Ab$ ) a nenavázaný  $Ag^*$ . Tyto dvě složky se následně oddělí pomocí CE a komplex se analyzuje metodou CEIA s EC detekcí [42].

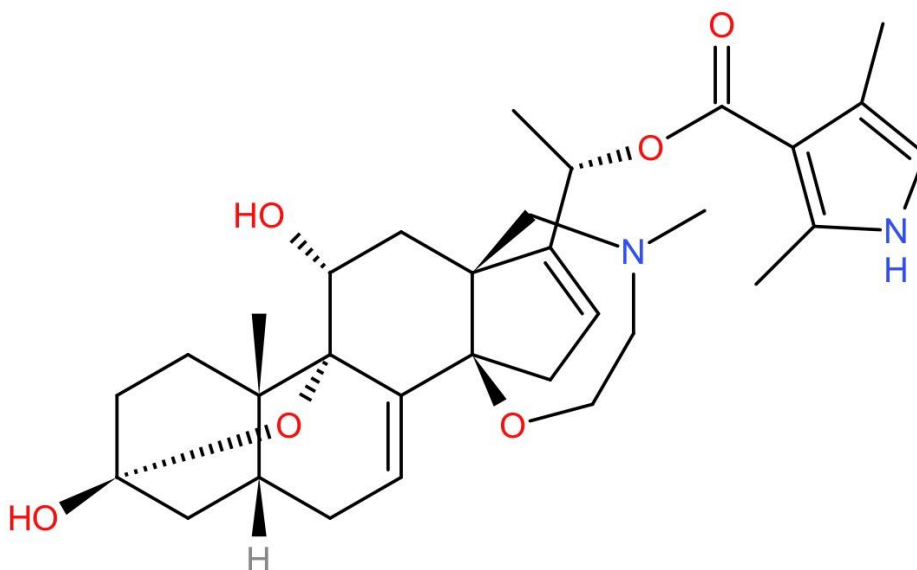
##### **ELISA**

STX bylo měřeno v plné a syntetické krvi. Pro účely měření musely být nejprve připraveny kalibrace. Do každé jamky destičky ELISA byly vloženy roztoky enzymového konjugátu, polyklonální králičí protilátky. Následně se destička v určitých intervalech pravidelně protřepávala, poté byl obsah destičky odstraněn, jamky byly promyty pufrům a do jamek bylo napipetováno definované množství substrátu. Ihned poté byla provedena spektrofotometrie, kde byla změřena absorbance při vlnové délce 450 nm. Tímto byly získány hodnoty koncentrací STX a jeho analogů NEO, GTX a dc-GTX [43].

## 4.5 JEDY OBOJŽIVELNÍKŮ

### 4.5.1 Batrachotoxin

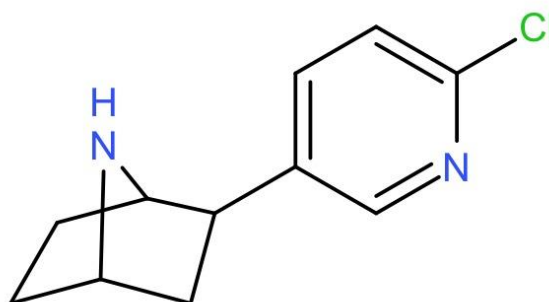
Jedovaté žáby z čeledi pralesničkovitých (*Dendrobatidae*), přezdívané také jako šípové žáby, ze své kůže vylučují alkaloidní toxiny. Jedním z těchto toxinů je batrachotoxin (BTX). Strukturální vzorec BTX je znázorněn na obrázku 16. Šípové žáby se jím přezdívá proto, že tento jed byl používán domorodci v deštných pralesech na šípky do foukaček určených k lovu zvířat. BTX je silným modulátorem napěťově řízených  $\text{Na}^+$  kanálků, tím je poté ovlivněna funkce nervů a svalů, fibrilace, arytmie a následné srdeční selhání. Kromě těchto příznaků také způsobuje po doteku s lidskou tkání necitlivost zastavením funkce nociceptivních neuronů. V nociceptorech vzniká a dále se přenáší signál o bolesti. Stejně jako většina zvířecích toxinů i BTX drasticky modifikuje hradlování  $\text{Na}^+$  kanálků, funguje jako agonista a posouvá práh aktivace k více hyperpolarizovanému napětí. Mimo to také inhibuje všechny procesy způsobující inaktivaci kanálu a také snižuje selektivitu pro ionty, takže jsou kanálky poté více propustné pro  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cs}^+$ . Tato látka je mnohem toxičtější než TTX, stačí 5x menší množství BTX pro usmrcení stejné oběti [44;45;46].



Obrázek 16 – Strukturální vzorec batrachotoxinu (převzato a upraveno z [47])

### 4.5.2 Epibatidin

Alkaloid nacházející se v kůži ekvádorské jedovaté žaby pralesničky trojbarvé (*Epipedobates tricolor*). Strukturální vzorec epibatidinu je znázorněn na obrázku 17. Funguje jako agonista a váže se na nikotinový acetylcholinový receptor, zároveň vykazuje velmi silné analgetické účinky. Ve velkých dávkách způsobuje hypertenzi, respirační paralýzu a následné záchvaty vedoucí ke smrti [46].



Obrázek 17 – Strukturální vzorec epibatidinu (převzato a upraveno z [48])

### 4.5.3 Analýza jedů obojživelníků

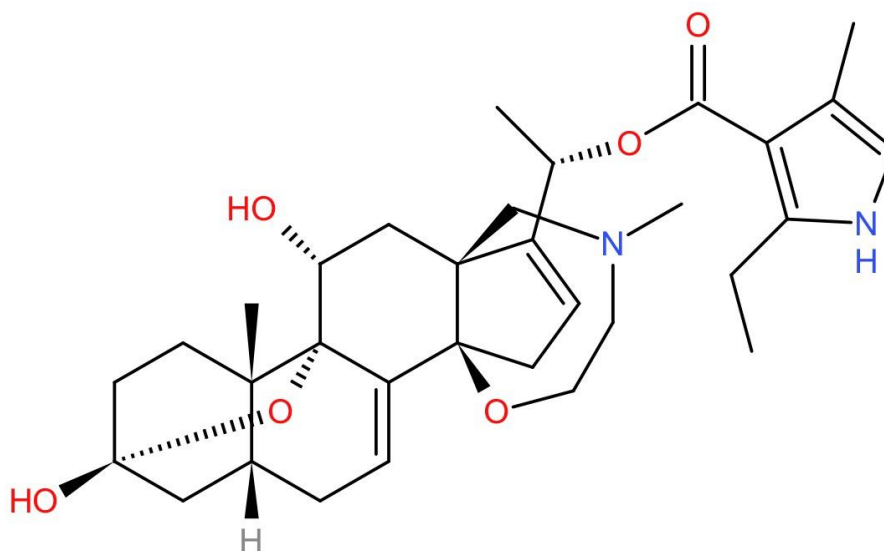
Vzorky plazmy obsahující BTX a epibatidin byly současně analyzovány metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS). Aby bylo možné vzorky plazmy analyzovat, musely být nejprve upraveny extrakcí kapalina-kapalina acetonitrilem a methanolem. Toxiny byly touto metodou separovány na koloně s reverzní fází, s využitím gradientové eluce kyselina mravenčí/acetonitril. Kvantifikace vzorků byla následně provedena pomocí hmotnostní chromatografie, kde byly analyzovány vnitřní standardy (IS) a oba vzorky. Výsledkem pak byla hmotnostní spektra batrachotoxinu, epibatidinu a IS, ze kterých byla poté určena koncentrace toxinů v plazmě [46].

## 4.6 PTAČÍ JEDY

Některé druhy ptáků obsahují mezi kůží a peřím jako ochranu také určité druhy toxinů [49;50;51].

### 4.6.1 Homobatrachotoxin

Příkladem těchto toxinů je například homobatrachotoxin, jedná se o steroidní alkaloid nacházející se u některých druhů pěvců rodu *Pitohui* a ptáka kosovec šoupálčí (*Ifrita kowaldi*). Jedná se o endemický druh ptáků nacházející se v oblasti Nové Guinei. S největší pravděpodobností si ptáci tyto toxiny izolují z potravinových zdrojů, nejspíše konzumací brouků rodu *Choresine*, kteří obsahují velké množství toxinů. To, že ptáci tyto brouky opravdu konzumují, bylo také dokázáno následnou analýzou obsahu žaludků ptáků. Strukturální vzorec homobatrachotoxinu je znázorněn na obrázku 18 [49;50;51].



Obrázek 18 – Strukturální vzorec homobatrachotoxinu (převzato a upraveno z [52])



#### 4.6.2 Analýza ptačího jedu

Pomocí metody HPLC s hmotnostní spektrometrií byl alkaloid homobatrachotoxin stanoven v peří u několika druhů ptáků *Pitohui*, ale také u ptáka kosovec šoupálčí (*Ifrita kowaldi*). Mimo homobatrachotoxinu byly v peří stanovené další toxiny spadající do skupiny batrachotoxinů.

Pro analýzu ptačích toxinů je nutné nejprve izolovat toxiny z tkání a peří ptáků. Po odebrání vzorků tkání se z těchto vzorků připravují surové ethanolvé nebo methanolvé extrakty. Ty jsou následně zkoncentrovány pod proudem dusíku a nadávkovány na kolonu kapalinového chromatografu s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie. Výsledky potvrzují přítomnost batrachotoxinu a homobatrachotoxinu nacházejících se převážně v peří zkoumaných ptáků [50].

## 5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zaměřit se na neurotoxické látky purifikované z jedů různých zvířat. Nejprve byla popsána struktura a funkce nervové soustavy, dále také vznik a přenos vzruchu na synapsi, protože tyto pochody v lidském těle neurotoxické látky narušují. Následně byly tyto látky rozděleny do několika skupin podle způsobu, jakým narušují nervový systém. Na závěr bylo popsáno působení konkrétních neurotoxických látek na lidský organismus a jejich stanovení pomocí různých analytických metod.

V bakalářské práci jsou popsány zvířecí neurotoxiny, které převážně narušují přenos nervového vzruchu mezi neurony. Nejčastěji ovlivňují aktivitu iontových kanálků, například tím, že se uzavřou jejich póry a blokuje pak tok iontů nebo často také modifikací hradlování. Některé toxiny jsou afinitní k receptorům či ovlivňují metabolismy neurotransmiterů.

Většina neurotoxických látek purifikovaných ze zvířecích jedů (s výjimkou TTX, STX a BTX) jsou peptidové povahy, pro jejich analýzu jsou nejčastěji využívány metody HPLC nebo RP-HPLC v kombinaci s dalšími stanovovacími metodami. Pro ostatní toxiny nebílkovinné povahy jsou využívány kromě HPLC metod, také UPLC, GC nebo různé další imunoanalytické metody v kombinaci s dalšími analytickými metodami a detektory.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LINHART, I. Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2012. ISBN 978-80-7080-806-1.
- [2] OREL, M. a V. FACOVÁ. Člověk, jeho mozek a svět. Praha: Grada, 2009. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-2617-5.
- [3] TROJAN, S. Lékařská fyziologie. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [4] JELÍNEK, J. a V. ZICHÁČEK. Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část). 9. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2007. ISBN 978-80-7182-213-4.
- [5] Neuron a jeho stavba. MENTEM trénujte svůj mozek. Brno: Mentem - brain training, 2015. Dostupné z: <https://www.mentem.cz/blog/neuron/>
- [6] FÍŠAR, Z. Úvod do biologické psychiatrie, Portál 1. lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze [online] 6.11.2006, ISSN 1803-6619.
- [7] KITTNAR, O. Lékařská fyziologie. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [8] What happens when the cell undergoes hyperpolarization? Quora. Castro Street, Mountain View: Quora, 2022. Dostupné z: <https://www.quora.com/What-happens-when-the-cell-undergoes-hyperpolarization>
- [9] CASARETT, L. J., J. DOULL a C. D. KLAASSEN. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2008. ISBN 978-0-07-147051-3.
- [10] MANN, J. Jedy, drogy, léky. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0508-0.
- [11] LI-SMERIN, Y. a K. J. SWARTZ. Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998, 95(15), 8585-8589. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.95.15.8585
- [12] LIAO, Z., C. YUAN, M. DENG, J. LI, J. CHEN, Y. YANG, W. HU, S. LIANG, Solution Structure and Functional Characterization of Jingzhaotoxin-XI: a Novel Gating Modifier of both Potassium and Sodium Channels. Biochemistry. 2006, 45(51): 15591-15600. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bi061457%2B>
- [13] MILESCU, M., H. C. LEE, C. H. BAE, J. I. KIM a K. J. SWARTZ. Opening the Shaker K<sup>+</sup> channel with hanatoxin. Journal of General Physiology. 2013, 141(2), 203-216. ISSN 1540-7748. Dostupné z: doi:10.1085/jgp.201210914
- [14] LAMPE, R. A., DEFEO, P. A., DAVISON, M. D., YOUNG, J., HERMAN, J. L., SPREEN, R. C., HORN, M. B., MANGANO, T. J., KEITH, R. A., Isolation and pharmacological characterization of omega-gammatoxin sia, A novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium-channel responses. Molecular Pharmacology. 1993, 44(2): 451-460. Dostupné z: <https://molpharm.aspetjournals.org/content/44/2/451.short>

- [15] MARVIN, L., E. DE, P. COSETTE, J. GAGNON, G. MOLLE a C. LANGE. Isolation, amino acid sequence and functional assays of SGTx1. The first toxin purified from the venom of the spider *Scodra griseipes*. *European Journal of Biochemistry*. 1999, 265(2), 572-579. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00726.x
- [16] WANG, M., J. DIAO, J. LI, TANG, J., LIN, Y., HU, W., ZHANG, Y., XIAO, Y., LIANG, S., JZTX-IV, a unique acidic sodium channel toxin isolated from the spider *Chilobrachys jingzhao*. *Toxicon*. 2008, 52(8), 871-880. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2008.08.018
- [17] XIAO, Y., a S. LIANG. Inhibition of neuronal tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> channels by two spider toxins: hainantoxin-III and hainantoxin-IV. *European Journal of Pharmacology*. 2003, 477(1), 1-7 ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-2999(03)02190-3
- [18] CAO, Z., Z. DI, Y. WU a W. LI. Overview of Scorpion Species from China and Their Toxins. *Toxins*. 2014, 6(3), 796-815. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins6030796
- [19] DU PLESSIS, L.H., D. ELGAR a J.L. DU PLESSIS. Southern African scorpion toxins: An overview. *Toxicon*. 2008, 51(1), 1-9. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2007.08.018
- [20] GARCIA, M. L., H. G. KNAUS, P. MUNUJOS, R. S. SLAUGHTER a G. J. KACZOROWSKI. Charybdotoxin and its effects on potassium channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1995, 269(1), C1-C10. ISSN 0363-6143. Dostupné z: doi:10.1152/ajpcell.1995.269.1.C1
- [21] QIU, S., HONG Y., H. LIU, Z. CAO, Y. WU a W. LI. Molecular Information of Charybdotoxin Blockade in the Large Conductance Calcium-activated Potassium Channel. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2009, 49(7), 1831-1838. ISSN 1549-9596. Dostupné z: doi:10.1021/ci900025n
- [22] LARABA-DJEBARI, F., C. LEGROS, M. CREST, CEARD, B., ROMI, R., MANSUELLE, P., JACQUET, G., VANRIETSCHOTEN, J., GOLLA, M., ROCHAT, H. The kaliotoxin family enlarged. Purification, characterization, and precursor nucleotide sequence of KTX2 from *Androctonus australis* venom. *Journal of Biological Chemistry*. 1994, 269(52), 32835-32843. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(20)30067-3
- [23] GAWADE, S. P. Snake Venom Neurotoxins: Pharmacological Classification. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. 2008, 23(1), 37-96. ISSN 0731-3837. Dostupné z: doi:10.1081/TXR-120030647
- [24] NISHIO, H., T. INUI, Y. NISHIUCHI, C. L. C., De MEDEIROS, ROWAN, E. G., HARVEY, A. L., KATO, E., YAMAZAKI, T., KIMURA, T., SAKAKIBARA, S. Chemical synthesis of dendrotoxin-I: revision of the reported structure. *The Journal of Peptide Research*. 1998, 51(5), 355-364. ISSN 1397002X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-3011.1998.tb01226.x

- [25] COLEMAN, M. H., S. YAMAGUCHI a M. A. ROGAWSKI. Protection against dendrotoxin-induced clonic seizures in mice by anticonvulsant drugs. *Brain Research*. 1992, 575(1), 138-142. ISSN 00068993. Dostupné z: doi:10.1016/0006-8993(92)90433-A
- [26] YANG, C. C. Chemistry of Snake Neurotoxins and Future Perspectives. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 1992, 39(6), 731-740. ISSN 00094536. Dostupné z: doi:10.1002/jccs.199200109
- [27] FALKENSTEIN, R. J. a C. PEÑA. Synthetic peptides derived from the central loop of fasciculín: structural analysis and evaluation as inhibitors of acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1997, 1340(1), 143-151. ISSN 01674838. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4838(97)00040-X
- [28] CHANG, L., S. LIN a C. CHANG. Unfolding/Folding Studies on Cobrotoxin from Taiwan Cobra Venom: pH and GSH/GSSG Govern Disulfide Isomerization at the C-Terminus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1998, 354(1), 1-8. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.1998.0660
- [29] SAUDI, M., A. ABDELMOULEH a A. EL FEKI. Tetrodotoxin: a potent marine toxin. *Toxin Reviews*. 2010, 29(2), 60-70. ISSN 1556-9543. Dostupné z: doi:10.3109/15569543.2010.487631
- [30] NOGUCHI, T. a O. ARAKAWA. Tetrodotoxin – Distribution and Accumulation in Aquatic Organisms, and Cases of Human Intoxication. *Marine Drugs*. 2008, 6(2), 220-242. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md6020220
- [31] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 11174599, Tetrodotoxin. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetrodotoxin>
- [32] YOU, J, Y YUE, F XING, W XIA, S LAI a F ZHANG. Tetrodotoxin poisoning caused by Goby fish consumption in southeast China: a retrospective case series analysis. *Clinics*. 2015, 70(1), 24-29. ISSN 18075932. Dostupné z: doi:10.6061/clinics/2015(01)05
- [33] CHO, H. E., S. Y. AHN, I. S. SON, S. IN, R. S. HONG., D. W. KIMA, S. H. WOO, D. C. MOON, S. KIMA. Determination and validation of tetrodotoxin in human whole blood using hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectroscopy and its application. *Forensic Science International*. 2012, 217(1-3), 76-80. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2011.10.026
- [34] KURONO, S., H. HATTORI, O. SUZUKI, T. YAMADA a H. SENO. Sensitive analysis of tetrodotoxin in human plasma by solid-phase extractions and gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Letters*. 2001, 34(14), 2439-2446. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1081/AL-100107525
- [35] KAWATSU, K., T. SHIBATA a Y. HAMANO. Application of immunoaffinity chromatography for detection of tetrodotoxin from urine samples of poisoned patients. *Toxicon*. 1999, 37(2), 325-333. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/S0041-0101(98)00116-0

- [36] WIESE, M., P. M. D'AGOSTINO, T. K. MIHALI, M. C. MOFFITT a B. A. NEILAN. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Marine Drugs*. 2010, 8(7), 2185-2211. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md8072185
- [37] RAPOSO, M. I. C., M. T. S. R. GOMES, M. J. BOTELHO a A. RUDNITSKAYA. Paralytic Shellfish Toxins (PST)-Transforming Enzymes: A Review. *Toxins*. 2020, 12(5) ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins12050344
- [38] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 56947150, Saxitoxin. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Saxitoxin>.
- [39] Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group. *EFSA Journal*. 2009, 7(4). ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2009.1019
- [40] BEN-GIGIREY, B., M.L. RODRÍGUEZ-VELASCO, A. OTERO, J.M. VIEITES a A.G. CABADO. A comparative study for PSP toxins quantification by using MBA and HPLC official methods in shellfish. *Toxicon*. 2012, 60(5), 864-873. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2012.05.022
- [41] UJEVIĆ, I., R. ROJE, Ž. NINČEVIĆ-GLADAN a I. MARASOVIĆ. First report of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from eastern Adriatic Sea (Croatia). *Food Control*. 2012, 25(1), 285-291. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2011.10.050
- [42] ZHANG, X. a Z. ZHANG. Capillary electrophoresis-based immunoassay with electrochemical detection as rapid method for determination of saxitoxin and decarbamoylsaxitoxin in shellfish samples. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012, 28(1), 61-68. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2012.07.008
- [43] WHARTON, R. E., M. C. FEYEREISEN, A. L. GONZALEZ, N. L. ABBOTT, E. I. HAMELIN a R. C. JOHNSON. Quantification of saxitoxin in human blood by ELISA. *Toxicon*. 2017, 133, 110-115. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2017.05.009
- [44] BOSMANS, F., C. MAERTENS, F. VERDONCK, TYTGAT. The poison Dart frog's batrachotoxin modulates Na v 1.8. *FEBS Letters*. 2004, 577(1-2), 245-248. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2004.10.017
- [45] MESSLINGER, K. What is a nociceptor? *Der Anaesthetist*. 1997, 46(2), 142-153. ISSN 0003-2417. Dostupné z: doi:10.1007/s001010050384
- [46] SHIRAIISHI, Y., T. OGAWA, T. SUZUKI, M. IWAI., M. KUSANO, K ZAITSU, F. KONDO, A. ISHII, H. SENO Simultaneous quantification of batrachotoxin and epibatidine in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Legal Medicine*. 2017, 25, 1-5. ISSN 13446223. Dostupné z: doi:10.1016/j.legalmed.2016.12.008
- [47] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 6324647, Batrachotoxin. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Batrachotoxin>.

- [48] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 1204, Epibatidine.  
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epibatidine>.
- [49] DUMBACHER, J. P., B. M. BEEHLER, T. F. SPANDE, H. M. GARRAFFO aj. W. DALY. Homobatrachotoxin in the Genus Pitohui: Chemical Defense in Birds? *Science*. 1992, 258(5083), 799-801. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1439786
- [50] UMBACHER, J. P., T. F. SPANDE a J. W. DALY. Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: A second toxic bird genus ( *Ifrita kowaldi* ) from New Guinea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, 97(24), 12970-12975. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.200346897
- [51] DUMBACHER, J. P., A. WAKO, S. R. DERRICKSON, A. SAMUELSON, T. F. SPANDE aj. W. DALY. Melyrid beetles ( *Choresine* ): A putative source for the batrachotoxin alkaloids found in poison-dart frogs and toxic passerine birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004, 101(45), 15857-15860. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0407197101
- [52] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 15559654, Homobatrachotoxin.  
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Homobatrachotoxin>.