

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2008

Bc. Andrea Sedláčková

Univerzita Pardubice
Fakulta zdravotnických studií

Syntéza nových reaktivátorů acetylcholinesterázy
inhibované pesticidy
Bc. Andrea Sedláčková

Diplomová práce
2008

Univerzita Pardubice
Fakulta zdravotnických studií
Katedra ošetrovatelství
Akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrea SEDLÁČKOVÁ**

Studijní program: **N5341 Ošetrovatelství**

Studijní obor: **Ošetrovatelství**

Název tématu: **Syntéza nových reaktivátorů acetylcholinesterázy
inhibované pesticidy**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Výběr zálmové oblasti diplomové práce
- 2) Konzultace s odborným vedoucím
- 3) Složení zkoušky BOZ pro práci v laboratoři
- 4) Zvolení literatury
- 5) Nastudování literatury
- 6) Stanovení cíle diplomové práce, metod a podmínek výzkumu
- 7) Práce v laboratoři
- 8) Analýza získaných dat
- 9) Konzultace úspěšnosti získaných výsledků a možnosti jejich využití
- 10) Interpretace výsledků do diplomové práce
- 11) Diskuze

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

50 stran

Forma zpracování diplomové práce:

tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- 1) BAJGAR, J. Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1985. ISBN 08-071-85
- 2) BENEŠ, V.; ŠRÁM, R. Pesticidy – prevenci otráv a první pomoc. 1. vyd. Bratislava: Technicko-informační služba – OOP chemické závody J. Dimitrova, 1968. ISBN 301-04-27
- 3) CREMLYN, R. Pesticidy. 1. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1985. ISBN 04-625-85
- 4) PATOČKA, J. a kol. Vojenská toxikologie. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s., 2004. ISBN 80-247-0608-3
- 5) ŠEVELA, K.; ŠEVČÍK, P.; KRAUS, R. a kol. Akutní intoxikace i intenzivní medicíně. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a. s., 2002. ISBN 80-7169-843-1
- 6) WAISSER, K. Biologicky aktivní organické látky. 1. vyd. Hradec Králové: Gaudeamus, 2006. ISBN 80-7041-092-2

Vedoucí diplomové práce:

prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc.
Fakulta zdravotnických studií

Datum zadání diplomové práce:

30. listopadu 2007

Termín odevzdání diplomové práce:

18. dubna 2008


prof. MUDr. Arnošt Pellant, DrSc.
děkan

L.S.


Mgr. Eva Hlaváčková
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. ledna 2008

SOUHRN

Teoretická část je zaměřená na organofosforové pesticidy a jejich vliv na lidský organismus, možnost diagnostiky a zacházení s takovými otravami.

Experimentální část obsahuje syntézu a in vitro testování nových reaktivátorů acetylcholinesterázy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Organofosforové pesticidy, acetylcholinesteraza, diagnostika, terapie otrav organofosfáty, reaktivátory.

TITLE

Synthesis of novel reactivators of pesticide-inhibited acetylcholinesterase

ABSTRACT

The theoretical part is focused on the organophosphorus pesticides and their influence on human organism, the possibility of diagnostics and treatment of such intoxications.

The experimental part contains the synthesis and *in vitro* testing of novel acetylcholinesterase reactivators.

KEYWORDS

Organophosphorus pesticides, acetylcholinesterase, diagnostics, treatment, reactivators.

Ráda bych poděkovala všem pracovníkům katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové, za možnost vypracovat tuto diplomovou práci. Zvláště bych chtěla vyjádřit poděkování Mgr. Kamilu Musílkovi, Ph.D. za vzorné vedení a praktické připomínky k teoretické a výzkumné části diplomové práce a za jeho trpělivost při její přípravě.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	10
1 ÚVOD	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 ORGANOFOSFOROVÉ SLOUČENINY.....	14
2.1.1 FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI ORGANOFOSFOROVÝCH SLOUČENIN.....	14
2.1.2 KINETIKA ORGANOFOSFÁTŮ	15
2.1.3 NEJČASTĚJI VYUŽÍVANÉ ORGANOFOSFOROVÉ PESTICIDY	16
2.1.3.1 Chlorfenvinphos.....	16
2.1.3.2 Demeton -S - metyl.....	16
2.1.3.3 Dichlorphos.....	16
2.1.3.4 Dimethoate.....	16
2.1.3.5 Malathion.....	17
2.1.3.6 Paraoxon	17
2.1.3.7 Parathion-etyl.....	17
2.1.3.8 Parathion-metyl	17
2.1.3.9 Trichlorfenol.....	17
2.2 CHOLINESTERÁZY	18
2.2.1 BUTYRYLCHOLINESTERÁZA	18
2.2.2 ACETYLCHOLINESTERÁZA	19
2.2.3 MECHANISMUS TOXICKÉHO ÚČINKU	19
2.3 PŘÍZNAKY INTOXIKACE	25
2.3.1 AKUTNÍ INTOXIKACE	26
2.3.2 PŘECHODNÝ SYNDROM	27
2.3.3 POZNÍ NEUROTOXICKÝ EFEKT	27
2.3.4 CHRONICKÁ INTOXIKACE	28
2.4 CESTY PŘENOSU ORGANOFOSFOROVÝCH SLOUČENIN.....	29
2.4.1 PERORÁLNÍ INTOXIKACE	29
2.4.2 INHALAČNÍ INTOXIKACE.....	29

2.4.3	TRANSDERMÁLNÍ INTOXIKACE	29
2.4.4	INTOXIKACE CESTOU OČNÍ	29
2.5	DIAGNOSTIKA OTRAV ORGANOFOFOROVÝMI SLOUČENINAMI	30
2.6	PRVNÍ POMOC	32
2.7	LÉČBA INTOXIKACE ORGANOFOFOROVÝMI SLOUČENINAMI	34
2.7.1	ANTICHOLINERGNI TERAPIE	34
2.7.2	REAKTIVÁTORY ACETYLCHOLINESTERAZY	34
2.7.3	OSTRANĚNÍ TOXINU Z KREVNIHO KOMPARTMENTU	36
2.7.4	JINÉ LÉČEBNÉ POSTUPY.....	37
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1	SYNTETICKÁ ČÁST	38
3.1.1	Obecná syntetická část	38
3.1.2	Příprava monokvarterní soli.....	39
3.1.3	Příprava biskvarterních solí	40
3.2	STANOVENÍ REAKTIVAČNÍCH PARAMETRŮ POTENCIO- STATICKOU METODOU IN VITRO	50
3.2.1	Princip metody	50
3.2.2	Postup měření.....	51
3.2.3	Výsledky měření in vitro	52
3.2.4	Hodnocení výsledků	53
	ZÁVĚR.....	54
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55

SEZNAM ZKRATEK

AChE – acetylcholinesteráza
ACh – acetylcholin
BCHL – bojové chemické látky
BuChE – butyrylcholinesteráza
BuOH – butanol
CNS – centrální nervový systém
DDT – dichlordifenytrichlorethan
DMF – N,N-dimethylformamid
EA – elementární analýza
ESI-MS – hmotnostní spektrometrie (electrospray ionization)
GABA – γ -aminomáselná kyselina
HEB – hemato-encefalická bariéra
ChE – cholinesteráza
l.t. – laboratorní teplota
MeCN – acetonitril
NMR – nukleární magnetická rezonance
OF – organofosfát
OFS – organofosforové sloučeniny
OFI – organofosforové inhibitory
OL – otravná látka
OP – organofosforové pesticidy
NMP – neuromuskulární ploténka
NPL – nervově-paralytické látky
NS – nervová soustava
TL – toxická látka
t.t. – teplota tání
VNS – vegetativní nervový systém

1 ÚVOD PRÁCE

Od počátku civilizace se jedinec snažil zlepšovat své podmínky na zachování úrody, která pro něj měla nesmírně velkou cenu a znamenala možnost přežití pro lidstvo. Již před mnoha lety známé osobnosti (např. zakladatel botaniky Theophrastus) popisovali napadení úrody jednotlivými nemocemi či škůdci a mnoho těchto nemocí bylo už v tomto období pojmenováno. Pesticidní přípravky se vyvíjely mnoho desítek let až do dnešní podoby. Jedním z hlavních požadavků pro jejich použití je vyrobit pesticid, který bude účinkovat na široké spektrum škůdců, ale zároveň bude šetrné jak pro aplikační zdroj, tak pro člověka samotného [4].

Pesticidy, je souhrnné označení pro chemické prostředky, určené k potlačení, ale i hubení organismů. S jejich využitím se setkáváme na zhruba 95 % zemědělské půdy. Pesticidy se rozdělují dle různých hledisek. Nejčastěji podle působení na [24]:

- zoocidy –pro boj se živočišnými škůdci
- fungicidy – proti plísňovým onemocněním rostlin
- herbicidy –k ničení plevelu v zemědělských monokulturách
- algicidy –k hubení řas
- arboricidy – přípravky proti nežádoucím dřevinám
- antimikrobiální pesticidy - baktericidy
- virucidy

Další dělení [24]:

Mezi pesticidy, které nemají přímý toxický účinek, řadíme:

- detergenty – zabraňují požeru, resp. inhibují příjem potravy
- repelenty – látky odpuzující hmyz
- atraktanty – působí na bázi feromonů a lákají hmyz do jednoduchých likvidačních pastí
- chemosterilanty – jsou určeny ke sterilizaci hmyzích sameček
- insekticidní hormony růstové inhibitory
- preparáty založené na účinku virů, hub, mikrobiálních pesticidů

Dělení, dle způsobu jejich použití:

- kontaktní (dotykové) pesticidy – účinná látka zůstává na povrchu a neproniká do organismu, pouze některé z nich mají hluboký efekt a tak pronikají do rostlinných pletiv
- systémové pesticidy – působí nejen na povrchu, ale pronikají kutikulou do buněk a jsou rozváděny cévním systémem, jejich nevýhodou je velmi častá náchylnost ke vzniku rezistence a nebezpečí fytotoxického vlivu na rostliny
- kombinované pesticidy – látky se systémovým i kontaktním účinkem
- kvazi-systém (mezostenické) pesticidy – látka působící na povrchu se ukládá do kutikuly, z níž se pomalu odpařuje

Podle způsobu aplikace:

- postřiky, aerosoly
- fumiganty
- popraše
- pevné a tekuté nástrahy
- mořidla
- nátěry a impregnace

Podle původu:

- přírodního původu (nikotin)
- syntetické látky (chlorované sloučeniny, organofosforové sloučeniny a deriváty, karbamátové sloučeniny, dithiokarbamáty, látky chinoidního charakteru, aromatické karbamáty aj.)
- biopreparáty – biopesticidy – jsou méně toxické vůči člověku, kulturním rostlinám a užitečnému hmyzu a mají kratší interval používání (hlavní skupiny: mikrobiální pesticidy, biochemické pesticidy, protektanty inkorporované do rostlin)

V diplomové práci jsem se zaměřila na jediný typ pesticidů, který se řadí mezi zoocidy. Jedná se o insekticidy. Mají za úkol proniknout do organismu hmyzu a inhibovat jejich životně důležité procesy a to zejména nervovou soustavu. Cestou vstupu této látky je nejčastěji jejich zažívací trakt, do kterého se látka dostane buď z povrchu listu (kontaktní insekticid) nebo je látka přímo v rostlině (systémový insekticid). Jejich účinnost závisí na schopnosti inhibice některých dějů probíhajících v hmyzu, na transportu do místa účinku a na

schopnosti hmyzu detoxikovat přítomnou látku. Jednou z nejdůležitějších látek, která se dříve hojně využívala (nyní je v mnoha zemích její použití zakázáno, včetně ČR) je skupina insekticidů organických sloučenin obsahujících chlor. Jejich nejznámějším zástupcem je DDT, dále také hexachlorcyklohexan (gama-HCH, gameta, lindan). Mechanismus účinku spočívá v zasažení nervové soustavy [24].

Inhibitory acetylcholinesterázy patří k další generaci insekticidů. Jedná se o látky, které pracují na principu zásahu do nervové soustavy, kde způsobují inhibici acetylcholinesterázy (dále AChE). Inhibicí AChE se zvyšuje koncentrace acetylcholinu (dále ACh) na všech místech, kde působí jako mediátor (na periferních efektech /M receptory/, ve vegetativních gangliích /N_N receptory/ a nervo-svalovém spojení / N_M receptory/) [24]. Díky jejich širokému využití a mechanismu působení, dochází ročně v mnoha zemích k intoxikaci osob, kteří s nimi pracují. Rozdíly mezi jednotlivými inhibitory jsou závislé na charakteru reakce s AChE [24]. Jedná se především o organofosforové sloučeniny a karbamáty.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ORGANOFOFOROVÉ SLOUČENINY

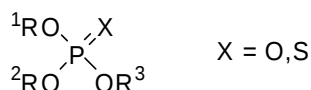
Organofosforové sloučeniny (OFS) patří k jedné z nejdůležitějších skupin pesticidů, které nahradily chlorované uhlovodíky (např. DDT) [23]. Jsou to látky, s kterými se můžeme setkat v zemědělství, kde se využívají jako insekticidy (hubení hmyzu), obecně pak o nich hovoříme jako o organofosforových pesticidech (OP). V menší míře se s nimi setkáváme v průmyslu (změkčovadla aj.) a ve zdravotnictví (výzkum nervových funkcí). Podobnou strukturu mají také nervově paralytické látky (NPL), působící na lidský organismus především svoji mimořádnou toxicitou, rychlým nástupem účinku, snadnou použitelností a vlivem na nervovou soustavu (NS) [2, 6]. Díky těmto vlastnostem byly organofosforové látky (OF) zneužívány pro vojenské účely.

2.1.1 FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI ORGANOFOFOROVÝCH SLOUČENIN

OF tvoří různorodou skupinu látek, vyznačujících se podobnými fyzikálně chemickými vlastnostmi. Jejich počátky sahají do 19. století, avšak jejich biologický efekt byl objeven ve 30. letech tohoto století [1]. Důkladný výzkum syntézy toxických organofosforových sloučenin se datuje k období před druhou světovou válkou. Cílem byla příprava nervově toxických plynů, které se uplatnily jako bojové chemické látky (BCHL) [4].

OF jsou odvozeny od kyseliny fosforové a fosforečné. Pesticidy jsou odvozeny převážně od kyseliny fosforečné, NPL jsou nejčastěji deriváty kyseliny fosforové. Estery kyseliny fosforové bývají toxičtější než analogické estery kyseliny fosforečné, navíc oxosloučeniny (přímé inhibitory) jsou toxičtější než jejich thio-analoga (nepřímé inhibitory), [7, 8, 22].

Jednu z největších skupin OF, pro kterou je charakteristický výrazný biologický účinek, lze znázornit obecným vzorcem (Obr. 1).



Obr. 1 Obecný vzorec organofosforových sloučenin.

R^1, R^2 = alkoxy, alkyl, substituovaná aminokyselina

Mezi hlavní chemické vlastnosti OF sloučenin patří alkylační a fosforylační reakce. Zejména fosforylační vlastnosti se projevují po vstupu do organismu, kde navíc mohou být metabolizovány pomocí řady katalyzovaných a nekatalyzovaných reakcí. Tyto reakce pak toxický efekt zvyšují, nebo se projevují jako reakce detoxikační [1].

Mezi reakce zvyšující toxický efekt patří oxidace, která se uplatňuje zejména u thio-sloučenin, oxidovaných na toxičtější oxo-sloučeniny (např. parathion na paraoxon) [1].

K detoxikačním reakcím patří redukce (nitroskupina na aminoskupinu), izomerizace, hydrolyza, která je většinou realizována enzymatickými systémy v organismu, dealkylace (triester na diester), degradace karboxyderivátů (ester nebo amid na kyselinu) a také reakce konjugace (s kyselinou glukuronovou a dalšími sloučeninami) [1].

Sloučeniny patřící ke skupině OF se vyznačují i silným lipofilním účinkem (rozpuštěnost v tucích a tukových rozpouštědlech). Díky lipofilnímu účinku mají schopnost absorpce a průniku přes hemato-encefalickou bariéru (HEB) [1].

S ohledem na chemickou strukturu a metabolismus, existují rozdíly ve vlastnostech sloučenin, ale z hlediska toxického účinku jsou tyto rozdíly méně důležité. Jako insekticidů se používá více než sto organofosfátových výrobků [20].

Organofosforové insekticidy inhibující AChE jsou široce rozšířené z důvodů, že [20]:

- vykazují vysokou účinnost jako insekticidy
- díky jejich chemické struktuře se rozpadají téměř úplně na neškodné degradační produkty během několika dnů, a proto přetrvávají jen krátkodobě v životním prostředí

2.1.2 KINETIKA ORGANOFOSFÁTŮ

Organofosfáty se vyskytují převážně jako kapaliny. Ke kontaminaci dochází převážně orálně a transdermálně. Některé jsou dobře rozpustné ve vodě i v tucích, kde se koncentrují a odtud jsou pomalu uvolňovány zpět do krve, z tohoto důvodu jejich toxické účinky recidivují nebo jsou prolongované. Těkavější organofosfáty (vysoký tlak par při pokojové teplotě) se dostávají do těla cestou inhalační nebo přes kůži [20].

Některé jsou u člověka zcela metabolizovány na méně toxické nebo inertní degradační produkty. Jiné se metabolizují pouze částečně, nebo mají nízkou či zanedbatelnou toxicitu. Další se mění na významně toxický metabolit (př. parathion) [20].

OF se detoxikují jaterní mono-oxygenázou s cytochromem P_{450} . Někteří zástupci jsou nejprve metabolizováni na sloučeniny s vyšší toxicitou, jako je tomu u parathionu, který se

metabolizuje na vysoce toxický paraoxon. Konečné metabolity po detoxikaci v játrech jsou vylučovány trávicím ústrojím [20].

2.1.3 NEJČASTĚJI VYUŽÍVANÉ ORGANOFOSFOROVÉ PESTICIDY

2.1.3.1 Chlorfenvinphos

O,O-diethyl-*O*-1-(4,5-dichlorofenyl)-2-chlorovinildietylfosfonát; **C₁₂H₁₄Cl₃O₄P**

Středně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v alkoholech. K absorpci dochází dermálním kontaktem a požitím ústy. Je rychle a úplně metabolizován a vyloučen za několik dní [20].

2.1.3.2 Demeton -S - metyl

Synonymum: Metasystox

O,O-dimethyl-S-(2-thiopentyl) monothiofosfonát; **C₆H₁₅O₃PS₂**

Rozpustnost ve vodě zanedbatelná, rozpustný v některých organických rozpouštědlech, absorbuje se požitím, inhalací a transdermálně. Rychle se rozpadá v důsledku oxidace a odstraněním metylových skupin. Vylučuje se převážně močí [20].

2.1.3.3 Dichlorphos

Synonymum: DDVP

O-(2,2-dichlorovinyl)-*O,O*-dimethyl fosfát; **C₄H₇Cl₂O₄P**

Rozpustnost ve vodě zanedbatelná, dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, využívá se ve své plynné fázi díky vysokému tlaku par. K požití dochází ústy, inhalačně a transdermálně, následně se rychle a úplně degraduje a jeho metabolity jsou vylučovány močí [20].

2.1.3.4 Dimethoate

O,O-dimethyl-S-(2-oxo-3-azabutyl)-dithiofosfát; **C₅H₁₂NO₃PS₂**

Vyznačuje se nízkou rozpustností ve vodě, vysokou rozpustností v některých organických rozpouštědlech. Rychle se absorbuje inhalační cestou, perkutánně a orálním požitím, jeho metabolity se rychle vylučují močí. Jeho toxicita je nižší než toxicita parathionu. V organismu nevykazuje žádné toxické symptomy po vniknutí inhalační cestou a transdermálně. Letální průběh je pozorován po požití 30 mg/kg [20].

2.1.3.5 Malathion

Dimethyl-S-(1,2-bis-carboethoxy)etylfosfordithioat; **C₁₀H₁₉O₆PS₂**

Vyznačuje se nízkou rozpustností ve vodě, je dobře rozpustný v některých organických rozpouštědlech, má česnekový zápach. Špatně se absorbuje kůží, jeho toxicita je střední, je méně toxický než parathion, vylučuje se močí a stolicí, většinou během 4 dnů [20].

2.1.3.6 Paraoxon

Synonymum: E 600

O,O-diethyl-*O*-(4-nitrofenyl)fosfát; **C₁₀H₁₄O₁₆NP**

Je hlavním metabolitem etylparathionu [20].

2.1.3.7 Parathion-etyl

Známy pod názvem: Nitrostigmin, Prathion, E 605

O,O-diethyl-*O*-(4-nitrofenyl)-monothionofosfát; **C₁₀H₁₄NO₅PS**

Je zanedbatelně rozpustný ve vodě, zato jeho rozpustnost je dobrá v mnoha organických rozpouštědlech. Vyznačuje se vysokou afinitou ke tkáním bohatým na tuk, zapáchá po česneku. Jeho metabolickou konverzí vzniká vysoce toxický paraoxon. Symptomy otrav jsou opožděné a mohou se projevit až po několika hodinách díky jeho prodlouženému chemickému působení [20].

2.1.3.8 Parathion-metyl

O,O-dimethyl-*O*-(4-nitrofenyl)-monothionofosfát; **C₈H₁₀NO₃PS**

Zanedbatelně rozpustný ve vodě, dobrá rozpustnost v mnoha organických rozpouštědlech, vysoká afinita pro tukovou tkáň, česnekový zápach. Toxicita jako taková je značně nízká. Je metabolizován na svůj vysoce toxický derivát paraoxon, proto je nástup symptomů otravy časově opožděný. Je vylučován močí, převážně jako metabolicky konečný produkt *p*-nitrofenol. Při masivní intoxikaci můžeme pozorovat letální konec [20].

2.1.3.9 Trichlorfenol

O,O-dimethyl-(2,2,2-trichloro-1-hydroxyetyl)-fosfonát; **C₄H₈Cl₃O₄P**

Rozpustný ve vodě a v některých rozpouštědlech. Po požití se rychle absorbuje, metabolizuje se většinou hydrolýzou a z organismu odchází močí a vydechovaným vzduchem [20].

2.2 CHOLINESTERÁZY

Objev cholinesteráz sahá na počátek 20. století. Roku 1914 H. Hallet získal Nobelovu cenu za objev, který potvrdil, že krev je schopna hydrolyzovat cholinové estery. Teprve po 2. sv. válce byla prokázána existence celé řady dalších esteráz. V posledních letech se výzkum této problematiky přesunul z oblasti teoretické, na stranu praktické aplikace. Zjistila se větší komplexnost účinků enzymů a otvírají se nové možnosti zkoumání. Cholinesteráza (ChE) se v lidském těle vyskytuje ve 2 typech. Liší se např. svoji strukturou, fyziologickou funkcí, afinitou k substrátům a inhibitorům, rozložením v organismu nebo kinetikou [13].

Prvním typem je acetylcholinesteráza (AChE, označuje se také jako pravá nebo specifická), která se nachází v nervových zakončeních, v plicích, v erytrocytech, slezině a ve všech částech mozku. Je vázaná membránovým glykoproteinem a existuje v několika molekulárních formách [13].

Butyrylcholinesteráza (BuChE, označuje se jako plazmová, pseudo nebo nespecifická) patří k druhému typu ChE. Vyskytuje se v plazmě a má více než 11 izoenzymatických variant. Dále se nachází v hladké svalovině, střevech, srdci, pankreatu, v játrech a v bílé hmotě mozkové [5, 13].

2.2.1 BUTYRYLCHOLINESTERÁZA

BuChE je enzym, který má podobnou molekulární strukturu jako AChE. Jejich shoda je v 65 % sekvencí aminokyselin, mají příbuzné molekulární formy a strukturu aktivního centra. Aktivní centrum obsahuje aminokyselinu serin. Jedná se o hydrolytický enzym, který se řadí ke karboxylesteraze typu B. Je tvořena čtyřmi identickými podjednotkami, kde každá obsahuje 574 aminokyselin a 9 sacharidových řetězců, postrádá anionické centrum a některé aromatické zbytky [5,17]. Od AChE se liší ve specifitě k některým substrátům (př. AChE hydrolyzuje acetyl- β -methylcholin a neštěpí benzoylcholin, u BuChE je to opačně). Vyskytuje se ve většině buněk, kromě erytrocytů. Její úloha je na úrovni buněčné proliferace. Slouží k udržení správné funkce myelinu, podílí se na podpoře růstu neuritů během vývoje jedince [8].

Je produkována jaterními buňkami (hepatocyty) a vyplavována do krve, kde v plazmě katalyzuje hydrolytické štěpení esterů cholinu a některých dalších substrátů. Pokles její syntézy a tím i aktivity v plazmě je dán hepatopatiemi (poškození jaterních buněk) nebo nedostatkem proteinů (diety). Ireverzibilní inhibice nastává v době jejího ovlivnění

organofosfátovými inhibitory, s kterými se nejčastěji setkáváme ve formě pesticidů v zemědělství, popř. účinkem BCHL. Experimentálně se využívá při léčbě kokainové závislosti. Je to specifický marker v diagnostice Alzheimerovy demence a v současnosti nabývá její význam jako profylaktický lék otrav způsobených inhibitory ChE [17, 18].

2.2.2 ACETYLCHOLINESTERÁZA

Enzym AChE patří do skupiny serinových esteráz. Hydrolyzuje acetylcholin (ACh) uvolňovaný z nervových zakončení do synaptické štěrbině při přenosu nervového vzruchu a uvnitř nervových zakončení odpovídá za rozklad cytoplazmatického acetylcholinu. Je tvořena dvěma peptidovými řetězci α a β [7]. V α -řetězci (aktivní místo enzymu) dochází k rozkladu ACh. V blízkosti aktivního místa se také nacházejí aminokyseliny histidin a glutamová kyselina. Aktivní místo je uloženo v hluboké a úzké prohlubni, na jejímž povrchu se nachází větší množství aromatických zbytků. Právě tento elektronově bohatý systém prostřednictvím katino- π interakcí, zajišťuje vazbu kvarterního dusíkového atomu substrátu k aktivnímu místu enzymu [21]. V řetězci β se nachází tzv. β -anionické místo a oblast hydrofobních interakcí, tzv. γ -anionické místo [7]. K hydrolýze ACh, účinkem AChE dochází tak, že se molekula substrátu přiblíží k aktivnímu centru enzymu. Dojde k přenosu acetylu na hydroxylovou skupinu serinu. ACh se rozštěpí na cholin, který je na enzym vázán jen slabými vazbami, a acetyl, který je přenesen z ACh na serinový hydroxyl esteratického centra. Důsledkem toho je vznik acetylované AChE, která během několika zlomků sekundy podléhá reaktivaci hydrolytickým odštěpením kyseliny octové [11].

Hlavní fyziologickou funkcí AChE je ukončení přenosu na cholinergních synapsích prostřednictvím hydrolýzy neuropřenašeče ACh [8, 17]. Při nedostatečném rozkladu ACh hrozí jeho kumulace v organismu, která se projeví tzv. akutní cholinergní krizí. Cholinergní krize vzniká na podkladě dlouhodobého nadměrného dráždění cholinergních receptorů. Tento jev se pak projeví různou škálou muskarinových, nikotinových a centrálních klinických příznaků [16].

2.2.3 MECHANISMUS TOXICKÉHO ÚČINKU

OFS mají schopnost působit na lidský organismus toxicky. Mohou vyvolat toxické příznaky během několika minut nebo i hodin, maximálně do 24 hodin s ohledem na dávku a způsob kontaminace [20]. Jejich toxicita je dána dráždivými, mutagenními, teratogenními,

karcinogenními, neurotoxickými a pneumotoxickými účinky. V CNS působí excitačně, ale i tlumivě. Mají vliv i na funkci testes a pankreatické žlázy. Podílejí se na řadě hormonálních změn v organismu, ovlivňují působení neurotransmiterů a mohou zasahovat do energetického metabolismu [16]. Kromě jiných mají další toxické účinky - cytotoxické poškození v játrech, ledvinách a hematologickém systému, poruchy metabolismu aminokyselin, vznik hyperglykémie [20].

Ovlivnění CNS spočívá v zásahu OFS do nervového systému, kde působí ireverzibilní inhibici acetylcholinesterázy (AChE), která je nezbytná pro správnou funkci cholinergního nervového systému. AChE způsobuje hydrolýzu (rozklad) neuromediátoru acetylcholinu, který přenáší nervové vzruchy na synaptických štěrbinách, na cholin a kyselinu octovou [16].

ACh je syntetizován z exogenně potravou dodávaného cholinu, a v organismu je acetylován pomocí acetylkoenzymu A. Tato reakce je katalyzována enzymem cholinacetyltransferázou. Po syntéze je v synaptických váčkách (presynaptickém útvaru) skladován ACh. Synaptické váčky se hromadí u synaptických štěrbin, ty se také označují jako aktivní zóna synapse. Synaptické váčky se při přenosu nervového vzruchu vyprazdňují do synaptické štěrbin a ACh reaguje s acetylcholinovým receptorem muskarinového nebo nikotinového typu na postsynaptické membráně. Jeho vazbou na receptor se mění prostorové uspořádání molekuly receptoru a v dosud nepropustné membráně vznikne pór, kterým se podle koncentračního spádu transportují ionty (kalium z buňky a natrium do buňky). Vzniklý elektrický potenciál se dále šíří po nervovém vlákne jako elektrický impuls. Otevření membrány trvá velmi krátkou dobu, protože okamžitě po navázání ACh na receptor, je ACh rozkládán AChE. Po rozložení ACh se receptor vrací do původního stavu [1, 19].

OFS působí inhibici AChE. K inhibici dochází mechanismem vazby OFS na aktivní místo AChE. Aktivní povrch je tvořen tzv. katalytickým centrem, které je složeno z tzv. esteratického místa, tvořeného karboxylovou skupinou serinu a z α -anionického místa, tvořeného karboxylovou skupinou kyseliny glutamové. Následkem inhibice AChE je nadměrné hromadění ACh na receptorech s následným dlouhodobým drážděním cholinergních receptorů. Tento účinek se pak projeví zvýšenou aktivitou vegetativní nervové soustavy (VNS), podrážděním CNS a zvýšenou aktivitou kosterního svalstva (Tab. 1) [1, 15, 16, 19].

Inhibitory AChE mají tu schopnost, že enzym buď acylují, nebo neacylují. Látky, které patří mezi neacylující inhibitory se váží na α -, β - a γ - anionické místo. Tato vazba má reverzibilní charakter (znovuobnovení aktivity AChE). Inhibitory reagující s esteratickým

místem AChE, tento enzym acylují. Inhibitor tohoto typu způsobí ireverzibilní inhibici. Do této skupiny inhibitorů patří nejen OF, ale i karbamáty [1].

Reaktivaci je možno urychlit pomocí některých nukleofilních činidel, např. oximů, které obnoví aktivitu AChE. U některých OF se můžeme setkat s procesem zvaným dealkylace. Dealkylace způsobí, že jedna z alkoxylových skupin navázaných na OFI je odštěpena účinkem vody. Tento děj se také nazývá „aging“ – stárnutí. Následkem tohoto stavu je nepřístupnost AChE pro účinek reaktivátorů a dealkylovaná AChE je nereaktivovatelná. Rychlost stárnutí je závislá na době kontaktu enzymu s danou látkou a na chemické struktuře inhibitoru [1,16].

Kromě akutního účinku, je u OF pozorován tzv. pozdní neurotoxický efekt (delayed neurotoxicity). Pozdní neurotoxicita byla pozorována u fosfátů a fosfonátů díky dealkylaci. Tento jev se následně projevuje poruchou funkce periferních neuronů [1].

V organismu po vstupu OF látek nastávají čtyři hlavní fáze: resorpce, transport, metabolizace, vlastní toxický efekt. Vlastní toxický efekt je uskutečněn pouze zlomkem působící látky, zbytek dávky představují ztráty nejrozličnějším způsobem, mohou se pohybovat až okolo 99 %. Po expozici toxickou látkou (kromě i. v. podání), můžeme pozorovat různě dlouhý interval zpoždění v nástupu účinku. Ten je dán schopností látky proniknout biologickými bariérami. V transportním systému pak reaguje OFS s cholinesterázami a dalšími enzymy, hlavně s karboxylesterásou a fosforylfosfatásou v plazmě. Tyto esterázy působí jako „vychytávači“ (scavengery) OFS díky tomu, že vazba jich samotných na látku nevyvolává žádné klinické příznaky intoxikace. Tento proces zmírňuje až zabraňuje rozvoji příznaků intoxikace vlivem jejich schopnosti navázat část látky, která vstoupila do organismu a tím ji vyřazuje z vlastního toxického účinku. Proto se pouze 1 – 3 % z celkové dávky toxické látky dostane na místo svého působení. Krevní oběh (transportní systém) zanesou toxickou látku (TL) na místo metabolického a toxického efektu. Metabolizace zahrnuje detoxikační reakci. V některých případech (hlavně u organofosforových insekticid) je vlastní látka oxidována a vzniklý derivát, který je toxičtější, je znovu vyplaven do krve a může být zdrojem nové intoxikace [16].

Tab. 1 Reakce efektorů na cholinergní impulzy

Efektor	Typ adrenergního receptoru	Cholinergní reakce
Srdce		
SA a AV uzel	β_1	Negativně inotropní
Síně	β_1	Negativně chronotropní
Komory	β_1	Negativně dromotropní
Hladké svaly cév		
Koronární	α ; β_2	Dilatace
Kožní	α	Dilatace (sympatikus)
Kosterních svalů	α ; β_2	Dilatace (sympatikus)
Mozkové	α	Dilatace
Plicní	α ; β_2	Dilatace
Břišní	α ; β_2	_____
Ledvin a nadledvin	α	Dilatace
Genitál	α	Dilatace
Slinných žláz	α	Dilatace
Vén (systémových)	α ; β_2	_____
Plíce		
Svaly bronchů	β_2	Kontrakce
Žlázy bronchů	?	Stimulace
Trávicí trakt		
Tonus a motilita	α ; β_2	Kontrakce
Svěrače	α	Relaxace
Sekrece		Stimulace

Žlučník	β	Kontrakce
Močový měchýř		
Detrusor	β	Kontrakce
Sfinkter	α	Relaxace
Ureter	α	Vzestup motility a tonu
Děloha		
Těhotná	α	Variabilní
Netěhotná	β	Variabilní
Pohlavní orgány		
Chámovody, penis	α	Erekce
Klitoris		Erekce
Oko		
m. dilatator pupillae	α	_____
m. sphincter pupillae		Mióza (kontrakce)
m. ciliaris	β	Akomodace na blízko (kontrakce)
Kůže		
m.errectores pilorum	α	_____
Potní žlázy	α	Generalizovaná sekrece (sympatikus)
Žlázy		
Dřeň nadledvin		Sekrece (adrenalin, nor-adrenalin)
Langerhansovy ostrůvky	α	_____
Šišinka	β	_____

Slinné žlázy	α	Serózní sekrece
	β	_____
Slzné žlázy		Sekrece
Nosohltanové žlázy		Sekrece
Slezina		
Pouzdro	α ; β 2	_____
Játra	α	Syntéza glykogenu
	β 2	Syntéza glykogenu
Tukové buňky	β 1	_____

2.3 PŘÍZNAKY INTOXIKACE

Z patofyziologického hlediska lze intoxikaci rozdělit do několika fází. Do první fáze patří vstup OF do organismu, přestup látky přes biologické bariéry do krevního řečiště, transport na místo metabolizace a toxického efektu a zde interakce s příslušnými enzymy. Druhou fázi charakterizuje hromadění ACh na nervových zakončeních a tím projevy jeho zvýšené koncentrace v těchto místech. K třetímu stádium patří řada biochemických a patofyziologických změn v důsledku účinku ACh na buněčných membránách. Poslední fáze, kterou můžeme pozorovat jen u některých OF, je charakterizována projevy pozdní neurotoxicity [1].

Masivní otrava OF je typická svým klinickým průběhem. Časový interval mezi expozicí a projevem prvních příznaků může být různě dlouhý. Je závislý na cestě vstupu OF do organismu, jeho množství a druhu [20].

Muskarinové (charakterizují vystupňovaný účinek nehromaděného acetylcholinu na synapsích VNS), nikotinové (dány kumulací ACh na NMP motorických nervů a gangliích) a centrální příznaky, vznikají v důsledku nadměrné stimulace cholinergního nervového systému, vlivem inhibice AChE. Tomuto stavu se také říká **akutní cholinergní krize** [16].

Takto vzniklý stav při nedostatečně rychlé pomoci, v případě těžkých až smrtelných intoxikací, vede k akutní respirační insuficienci, která je dána poruchou dechových center a paralýzou dýchacích svalů (včetně bránice). Po překonání akutního stádia otravy, je v klinickém obraze dominantní celkový metabolický rozvrat v důsledku dlouhodobé hypoxie a acidózy. Tyto stavy se pak projevují řadu měsíců jako neurologické a neuropsychické příznaky [16].

Mezi velmi závažné důsledky akutní intoxikace patří i **nespecifický účinek těchto látek**, který vede k morfologickému poškození nervové tkáně. Příčinou tohoto stavu je pravděpodobně nadměrné vyplavení glutamátu, vzniklé stimulací glutamatergních neuronů, tzv. receptorů N-methyl-D-aspartátu. Aktivací těchto receptorů dochází k nadměrné akumulaci vápníku uvnitř neuronů a to vede k následné neurální smrti. Tyto morfologické změny jsou důsledkem dlouhodobého přetrvávání neurologických příznaků [1, 16].

Specifickou komplikací otrav je její remise, která vzniká na podkladě vyplavení otravné látky z depotních míst (z tukové tkáně), nebo uvolněním OL z vazby na bílkoviny krevní plazmy. Specifická komplikace může vzniknout i v důsledku letální syntézy (po metabolizaci méně toxického OF na toxičtější) [1, 16].

Lehká otrava OF se projevuje zejména centrálními a muskarinovými příznaky. Vzniká až po určité době latence (několik minut). Ze subjektivních příznaků se objevují bolesti hlavy, pocit tlaku a bolesti v očích, zejména při akomodaci. Je pocíťována zvýšená únava či dráždivost, úzkostné stavy, závratě, trnutí či bolesti končetin, pocit tíže na hrudi, ztížené dýchání, nevolnost, nucení na močení či na stolicí, bolesti břicha. K objektivním příznakům patří mióza, překrvení spojivek, zvýšené slzení a sekrece z horních dýchacích cest, bledost pokožky. Intoxikovaný si stěžuje na dušnost, kterou provází dráždivý kašel s vykašláváním vazkého hlenu [1].

2.3.1 AKUTNÍ INTOXIKACE

Muskarinové příznaky vznikají vlivem stimulace muskarinových receptorů autonomního nervového systému [1, 3, 16, 20]:

- projevy na zornicích – mióza, poruchy akomodace (nejasné vidění a bolesti v očích), v 20 % případů mióza z neznámých důvodů chybí
- zvýšené slzení a pocení
- nadměrné slinění, rhinitis
- bronchiální hypersekrece kombinovaná s bronchospazmem a sípáním
- nonkardiální plicní edém – klasický plicní edém se vyskytuje pouze výjimečně, ale díky excesivní bronchiální sekreci hlenu se může rozvinout plicní edém
- může být přítomen kašel a časná cyanóza
- abdominální symptomy – abdominální napětí, křeče, nauzea, zvracení, průjmy, tenesmy, fekální inkontinence, polakysurie a močová inkontinence
- kardiovaskulární symptomy: bradykardie, hypotenze, díky stimulaci sympatického nervového systému se můžeme setkat s ventrikulární tachykardií a hypertenzí

Nikotinové příznaky způsobené stimulací nikotinových receptorů [1, 3, 16, 20]:

- deprese nebo paralýza všech autonomních ganglií a skeletálního svalstva
- mimovolné dráždění svalů obličeje a hrudníku díky nepřetržité vysoké koncentraci ACh na nervosvalových ploténkách pruhovaného svalstva
- excitace svalů hrudníku zhoršuje plicní ventilaci
- svalové záškuby a fascikulace mohou být následovány generalizovanou paralýzou v důsledku permanentní depolarizace

- tachykardie, bledost, poruchy metabolismu glycidů (→ hyperglykémie) vznikají následkem stimulace sympatických ganglií díky nadměrnému uvolňování katecholaminů (tento jev často překrývá muskarinový efekt)
- změny propustnosti buněčných membrán - zvýšený únik draslíku z intracelulárního prostoru – vznik hyperkalémie (díky permanentní depolarizaci koncových nervových plotének)
- metabolická acidóza

Centrální příznaky jsou spojeny s permanentními vysokými koncentracemi ACh v mozku [1, 3, 16, 20]:

- závratě, psychická tenze, úzkost, nespavost, bolesti hlavy, nejasná řeč, porucha koncentrace, depresivní stavy, noční můry a snění
- generalizovaná slabost, kóma s areflexií, křeče, Cheyne-Stokesovo dýchání, respirační a oběhová deprese, paralýza dýchání a hypertermie

2.3.2 PŘECHODNÝ SYNDROM

Tento syndrom je spojen s paralýzou proximálních svalů končetin, krčních flexorů, motorických kraniálních nervů a dýchacích svalů. Objevuje se zhruba za 24 až 96 hodin po otravě. Základní patofyziologie je dosud nejasná a diskutabilní. Pravděpodobně je způsoben vyloučením oximů z léčebného schématu, předčasnou extubací a předčasným ukončení podávaného atropinu [20].

2.3.3 POZDNÍ NEUROTOXICKÝ EFEKT

Stav, který se manifestuje za několik dní až týdnů po expozici a je způsoben pouze některými typy organofosforových inhibitorů cholinesteráz. Je charakterizován motorickými a senzorickými poruchami, degradací axonů a následnou degradací myelinu, inhibicí a později dealkylací tzv. neurotoxické esterázy. Klinický průběh je u poloviny otrávených charakterizován příznaky akutní otravy, která však nemusí být klinicky diagnostikována. Po tomto období nastává zhruba od 7 dní do 1 měsíce latentní fáze. Po uplynutí tohoto období může nastat fáze cholinergního dráždění s typickými příznaky jako je zvýšená sekrece z horních dýchacích cest, slzení, faryngitida, laryngitida. Dalším přidruženým symptomem jsou bolesti až parestzie končetin, které se charakterizují jako různý stupeň bolestí v lýtkách

až jejich krečovými stavy. Později dominují obrny volných pohybů s minimálním postižení senzitivní inervace. Za 1–2 měsíce nastává stádium denervace, po kterém se u postižených objeví těžká atrofie svalů na horních a dolních končetinách. Tato fáze obvykle trvá po dobu 2–6 měsíců. Období rekonvalescence, po takto proběhlém stavu, bývá velmi dlouhé a ještě po několika letech se můžeme setkat se sklony k elasticitě a abnormálním šlachovým reflexů [1, 16, 20].

2.3.4 CHRONICKÁ INTOXIKACE

Po opakované expozici OF o nízkých koncentracích se může objevit chronická otrava, která vzniká na podkladě kumulace účinku. Dochází k postupné inhibici AChE na cholinergních nervových synapsích a k senzibilizaci receptorů na zvýšenou hladinu ACh. Tento stav může vést u takto postižených jedinců ke smrti i po styku s velmi nízkou dávkou OF, která by jinak zdravého neusmrtila. Období chronické intoxikace může být zcela bezpříznakové, jindy se u intoxikovaného objevují nespecifické příznaky (poruchy spánku, emoční labilita, zvýšená únavnost apod.). Při nejasnostech je nutno provést nezbytné laboratorní testy a zahájit včasnou terapii [1].

Možné efekty chronických otrav:

- karcinogenita –schopnost vyvolat vznik zhoubného nádoru
- mutagenita –schopnost vyvolat změnu ve struktuře nebo pořadí bází v DNA, změna genetické informace
- teratogenita – schopnost způsobit vznik vrozených vývojových vad, zasahují do embryonálního vývoje
- onkogenita – indukce růstu nádorů
- poškození jater
- reprodukční poruchy – poruchy v rámci funkceschopnosti spermií a schopnosti reprodukce ženy (sterilita, infertilita)
- strumigenní účinky aj.

2.4 CESTY PŘENOSU ORGANOFOFOROVÝCH SLOUČENIN

2.4.1 PERORÁLNÍ INTOXIKACE

Nejčastější způsob přenosu, který vzniká náhodně nebo při suicidiálním chování. Celý obraz závisí na dávce a toxicitě použitého OF. U intoxikovaného se nejprve objevují gastrointestinální symptomy, které jsou charakterizovány bolestí břicha, nevolností, zvracením atd. Ze subjektivních příznaků si pacient stěžuje na svalovou slabost s bolestmi ve svalích, ztížené dýchání a zhoršené vidění. Pacient má pocit úzkosti, bolest hlavy, nesoustředěnost, útlum nebo zvýšenou excitabilitu. Objektivně se projevuje mióza, zvýšená střevní peristaltika, nepravidelné dýchání s kašlem. Z dalších příznaků je dynamická hypersekrece z dutiny nosní, zvýšené slzení, bradykardie. V pokročilém stádiu rozvoje intoxikace dochází ke svalovým fibrilacím, které přecházejí v tonicko-klonické křeče až bezvědomí [1]. Přes zažívací trakt se mohou vstřebat látky rozpustné ve vodě (v trávicích šťávách – hydrofilní látky) [23].

2.4.2 INHALAČNÍ INTOXIKACE

Jsou zvýrazněny příznaky z dýchacího ústrojí oproti gastrointestinální symptomatologii. Průběh otravy je rychlejší a centrální příznaky se rozvíjejí podstatně rychleji díky přestupu látky stěnou alveolů do krevního oběhu [1].

2.4.3 TRANSDERMÁLNÍ INTOXIKACE

Otrava probíhá v prolongované formě, včetně doby latence, která může být až několika hodinová. Zasažený má spíše gastrointestinální obtíže. Dechová a centrální symptomatologie je méně výrazná. Rozsah intoxikace závisí na schopnosti látky proniknout přes kůži, na její rozpustnosti v tucích a v potu. Čím více je kůže prokrvená, tím snazší je vstřebání [1].

2.4.4 INTOXIKACE CESTOU OČNÍ

Projevuje se velmi intenzivními místními příznaky, jako je mióza a následná porucha akomodace. Dále je pozorováno ztížené dýchání a příznaky gastrointestinální [1].

2.5 DIAGNOSTIKA OTRAV ORGANOFOFOROVÝMI SLOUČENINAMI

Stanovení diagnózy u otrav OFS musí být velmi rychlé. V diferenciální diagnostice je nutno odlišit otravu OF od stavů tetanie, epileptických prolongovaných stavů a otrav kyanovodíkem či jinými látkami. Důležité jsou klinické příznaky jedince a laboratorní stanovení hladin aktivity erytrocytární AChE, která se hodnotí oproti normální 100 % hodnotě, dále se využívá stanovení hladiny plazmatické BuChE. Podle poklesu aktivity AChE lze akutní intoxikaci rozdělit do tří kategorií (Tab. 2).

60-40 %	mírná intoxikace
40-20 %	střední intoxikace
20-0 %	život ohrožující intoxikace

Tab. 2 Hodnocení intoxikace organofosforovými sloučeninami podle poklesu aktivity acetylcholinesterazy.

Na stanovení aktivity erytrocytární AChE není v mnoha případech čas vzhledem k rychlé progresy stavu. Častěji je dostupná a měřitelná aktivita AChE v plazmě (tzv. pseudocholinesteráza). Ta je mnoha autory zpochybňována, protože hladiny AChE v plazmě regenerují rychleji než v erytrocytech. Pokud je podezření na otravu způsobenou OFI, je nutné zajistit terapii ihned a bez jakéhokoliv odkladu [1, 2, 20, 23]. Z dalších nespecifických příznaků při laboratorním vyšetření je leukocytóza a zvýšená aktivita jaterních aminotransferáz [16]. U některých intoxikací OF můžeme detekovat metabolit dané látky v moči (př. parathion - p-nitrofenol), [1].

Aktivita enzymů za normálních okolností je ovlivněna pohlavím (u žen je aktivita nižší než u mužů), věkem (do dospělosti aktivita enzymů stoupá, po pátém decenniu klesá) a výživou. K faktorům, které se také podílejí na její hodnotě patří hormonální působení, stres, gravidita, některá neurologická onemocnění, farmakologické preparáty a genetická dispozice [1].

Z klinického hlediska je možno využít i k diagnostice hladinu plazmatické nebo sérové BuChE. Její hodnota však může být ovlivněna mnoha faktory (včetně těch, které jsou popsány výše). Aktivita je snížena u rozsáhlých neoplazií jater, při akutním poškození jater organickými rozpouštědly a houbovými toxiny; také při popáleninách, diabetu a proteinurii. Zvláštním stavem, který je provázen jejím snížením je hereditární nedostatek BuChE. Zvýšení její aktivity je typické hlavně v počátečních stádiích intoxikací organickými

rozpouštědly, u některých vzácných onemocnění, u dětí s nefrotickým syndromem a u schizofreniků [1].

Ke stanovení aktivity cholinesteráz se využívá mnoho metod, k nejrozšířenějším patří [1]:

- elektrometrické – při nichž je měřena změna potenciálů, způsobená protony, uvolňovanými při hydrolýze substrátu ve slabě pufovaném prostředí
- titrační – využívají neutralizace při hydrolýze vznikající kyseliny louhem při zachování konstantního pH
- manometrické – založeny na měření objemu CO_2 uvolněného z bikarbonátu kyselinou vznikající při hydrolýze substrátu
- kolorimetrické – určují změnu pH pomocí indikátoru, dále může být stanoven i nerozložený substrát
- radiometrické metody
- jiné metody, např. kalorimetrické či enzymatické

2.6 PRVNÍ POMOC

Těžké otravy jsou provázeny velmi dramatickým obrazem s ohrožením základních životních funkcí. Vzhledem k této závažnosti je nutné zahájit co nejdříve poskytování první pomoci a specifickou terapii. Obecné zásady první pomoci jsou společné pro jakoukoliv látku a spočívají v [1, 20, 23]:

Zamezení dalšího pronikání jedu do organismu

- opuštění zamořeného prostoru, u jedince v bezvědomí jeho bezpečné vynesení
- při pronikání látky kůží, odstranění kontaminovaného oděvu a odmoření exponované pokožky
- při zamoření očí následuje výplach spojivkových vaků, buď vodou (v nemocničním zařízení fyziologickým roztokem) a následným vkápnutím 1% roztoku atropinu, nebo 2% bikarbonátu sodného
- u perorálních otrav je důležité mechanicky vyvolat zvracení a ve zdravotnických podmínkách provádět výplachy žaludku s adsorbenciem (živočišné uhlí, 50 g a více), před tím je nutno zajistit otráveného před aspirací (intubace)
- adsorpční uhlí je nejúčinnější, protože na sebe váže látky v GITu, současně snižuje hladinu některých toxinů v krvi vytvořením negativního difúzního gradientu mezi střevním lumenem a krví, princip tzv. gastrointestinální dialýzy
- adsorbens nepodáváme u pacientů s poruchou vědomí a křečemi, pokud nemají zavedenou žaludeční sondu a nejsou zaintubováni
- z pesticidů se špatně adsorbuje na adsorpční uhlí malathion, DDT a karbamáty

Zabezpečení základních životních funkcí

- Rautekova zotavovací poloha
- při dechové nedostatečnosti, se zahájí po odmoření kůže obličeje, umělé dýchání
- při srdeční zástavě provádíme nepřímou srdeční masáž

Protikřečová terapie

- aplikujeme antikonvulzivum (diazepam, alprazolam, clonazepam) dle potřeby

Antidotní terapie v první pomoci

- v první pomoci se užívá autoinjektor Combopene I[®] s atropinem a obidoximem, Combopone II[®] s diazepamem, lyofilizát pro i.v. Antiva[®] (HI-6) v kombinaci atropinem nebo biperidenem

Zajištění včasného odvozu do zdravotnického zařízení

2.7 LÉČBA INTOXIKACE ORGANOFOFOROVÝMI SLOUČENINAMI

Terapie intoxikací zahrnuje léčbu bronchopulmonálních projevů, podávání anticholinergik jako antidótní terapie v kombinaci s reaktivátory cholinesteráz [1, 2, 3, 20].

Prvním krokem v léčbě bronchopulmonálních projevů je časné odsátí sekretu u pacientů s nazotracheální nebo endotracheální intubací. Nutností je dokonalá ventilace plic k zachování adekvátního okysličení [20].

2.7.1 ANTICHOLINERGNÍ TERAPIE

Z anticholinergik je podáván atropin. Atropin jako kompetitivní antagonist zablokuje účinek nahromaděného ACh hlavně na periferních, ale i centrálních (méně, z důvodu obtížného průchodu přes HEB) muskarinových receptorech. Aplikuje se při každé intoxikaci organofosfáty a je nutné je podat před aplikací specifických antidot, jako jsou pralidoxim nebo obidoxim. Antagonizuje zejména muskarinové účinky ACh, nereaktivuje cholinesterázu, není ovlivňován hladinami AChE, neblokuje OF. Jeho účinkem je snižování bronchiální sekrece. Celková dávka atropinu může dosáhnout až 100mg za 24 hod. U středně těžkých a těžkých otrav je možné léčbu doplnit i podáváním benaktyzinu (anticholinergikum s centrálním účinkem), který účinkuje na CNS a příznivě ovlivňuje křečové stavy [1, 2, 20]. Na základě experimentálních výsledků je možno podávat i anticholinergika s převahou centrálního účinku jako je skopolamin nebo biperiden [1, 16]. Teprve po podání atropinu následuje podávání tzv. reaktivátorů cholinesterázy [20].

2.7.2 REAKTIVÁTORY ACETYLCHOLINESTERÁZY

Reaktivátory AChE jsou součástí antidotních přípravků využívajících při terapii otrav OFI. Jako oximy jsou označovány z důvodů, že obsahují v molekule funkční oximovou skupinu, která je při pH lidské krve částečně disociována na nukleofilní oximátový anion [10, 12, 22].

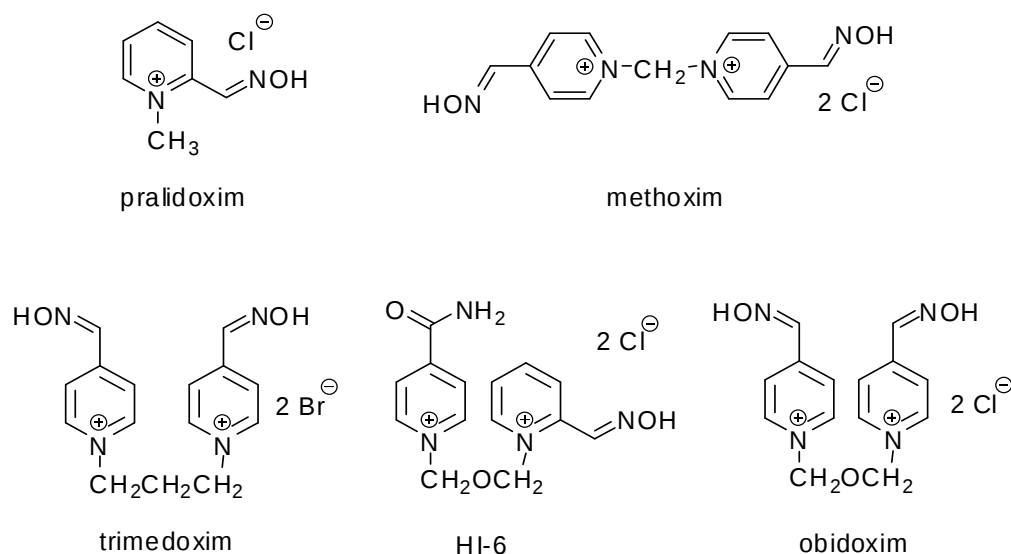
Reaktivace je proces, kde je inhibované serinové protease navrátna její katalytická funkce. To znamená, že jejich úkolem je štěpit kovalentní vazbu vzniklou při ireverzibilní inhibici enzymu AChE [12].

Struktura reaktivátorů zahrnuje několik znaků, které ovlivňují rychlost a účinnost reaktivace:

- přítomnost kvarterního dusíku v molekule reaktivátoru – zajistí afinitu k enzymu
- přítomnost oximové skupiny – vlastní nukleofil štěpící ireverzibilní vazbu mezi OFI a enzymem
- tvar a délka spojovacího řetězce mezi oběma kvarterními dusíky – u biskvarterních reaktivátorů

Účinek reaktivátorů závisí také na rychlosti dealkylace (stárnutí), při kterém je inhibovaná AChE změněna tak, že je účinku reaktivátorů nepřístupná, je v tzv. nereaktivovatelné formě. Rychlost stárnutí inhibované AChE závisí na době kontaktu enzymu s NPL a na chemické struktuře inhibitoru [16]. Tento proces má zásadní význam při terapii otrav. Reaktivátor musí být podán co nejdříve, v dostatečné koncentraci a aplikován po dostatečně dlouhou dobu [22].

Prvním prakticky využitým reaktivátorem byl pralidoxim, který byl syntetizován v roce 1955 Wilsonem v Anglii. **Pralidoxim** (2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium chlorid, 2-PAM) patří k nejběžněji užívaným reaktivátorům. Dále našel své využití i **obidoxim** [1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropan dichlorid], **HI-6** [1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxapropan-dichlorid], **trimedoxim** [1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)propan dibromid] a **methoxim** [1,1-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)methan dichlorid; Obr. 2)], [9]. Žádný z dosud známých reaktivátorů nevykazuje schopnost působit na všechny typy NPL.



Obr. 2 Komerčně dostupné reaktivátory acetylcholinesterazy.

Pokud nemůžeme jasně určit typ OFI, který otravu způsobil, je účelné provést reaktivační test. Ten spočívá v odběru krve a v aplikaci reaktivátorů a ve stanovení, který je schopen nejvíce obnovit aktivitu AChE. HI-6 je v současné době označován jako nejvíce širokospektrý reaktivátor [10, 12].

Pralidoxim je jediným zástupcem monokvarterních oximů. Je dostupný jako chlorid (Contrathion), iodid (2-PAMI), mesylát (P2S). Může být zpočátku podáván intravenózní injekcí pomalu v dávce 15-30 mg/kg jak u dospělých, tak u dětí. Doporučená aplikace je po dobu 15-30 minut. Rychlé dávkování by mohlo způsobit ospalost, tachykardii, laryngeální spazmus, svalovou rigiditu a přechodnou neuromuskulární blokádu. Může být podáván intravenózně v infuzi v 100 ml fyziologického roztoku nebo subkutánní či intramuskulární injekcí. Dále pralidoxim podáváme každých 3-8 hodin, maximální dávka je 12 g/24 hodin. Existuje i v orální formě, které se využívá při méně závažných otravách bez významných gastrointestinálních symptomů [20].

Obidoxim patří k biskvarterním oximům. Je dostupný jako chlorid (Toxogonine®). Může být zpočátku podáván pomalu intravenózně v dávce 3 mg/kg. Dávka u dospělých dosahuje hladiny 250 mg. Dětem by nemělo být podáno během 24 hodin více jak 5 mg/kg [20].

Tato antidota se používají po dobu 48 hodin po intoxikaci. Nejsou účinná na otravy, které jsou způsobené – metylorganofosfátovými estery jako metyldiazinon, dimethoat, endothion, fenthion, formothion, malathion, trichlorfon ad. [20].

K nevhodným vlastnostem reaktivátorů AChE patří špatný průnik do CNS. Jsou rychle vylučovány močí, částečně nezměněné, částečně jako metabolity, za 1-3 hodiny. Pokud se u pacientů objeví poruchy ledvin, je nutné dávky redukovat [7, 8, 20].

Dalším krokem je důsledné monitorování saturace krve kyslíkem a nepřetržité monitorování kardiovaskulárních funkcí. Mezi léčebné postupy, které se provádějí v rámci respirační insuficience je resuscitace a navazující řízené dýchání s farmakologickou podporou dýchání [1, 20].

2.7.3 OSTRANĚNÍ TOXINU Z KREVNÍHO KOMPARTMENTU

Forsírová diuréza pro renální eliminaci má sporný význam, vzhledem k tomu, že většina organofosfátů je degradována v játrech a teprve potom je vyloučena močí. Může být účinná u akutních otrav látkami, které nejsou vázány na krevní bílkoviny. Úspěšnost diurézy

nemůžeme očekávat u hemodynamicky nestabilních pacientů, kde není dostatečný krevní průtok ledvinami. Nejčastějšími komplikacemi této terapie jsou pneumotorax po kanylaci velkých žil (měření CVT), hemothorax, pokles krevního tlaku a minerálová dysbalance. Kontraindikací jsou renální insuficience, srdeční selhání, hypotenze nereagující na podání tekutin nitrožilně, maligní hypertenze nereagující na antihypertenzní terapii a hypokalemie [20].

Mimotělní eliminační metody jsou další možností. Hemoperfuze je účinnější než hemodialýza, ale množství odstraněné látky se pohybuje v rozsahu několika miligramů, někdy gramů. Hemoperfuze je účinná tehdy, je-li zahájena co nejdříve po vniknutí OF do organismu (ve fázi absorpce OF). Tehdy může být odstraněno nejvíce toxinů. Principem je průtok krve perfundovanou kolonou, která je vyplněna adsorpčním materiálem, na jehož povrchu jsou vychytávány toxické látky, včetně látek vázaných na krevní bílkoviny. Je možno kombinovat hemoperfuzi s hemodialýzou. Kombinace těchto metod umožní zvýšit eliminaci látek (např. paraoxon – rozpustný ve vodě), zlepšit acidózu (hydrogenkarbonátová hemodialýza) a pomůže odstranit nadbytečnou tekutinu (ultrafiltrace). V případě rozvinutí závažné intoxikace jsou mimotělní metody zbytečné [20].

2.7.4 JINÉ LÉČEBNÉ POSTUPY

Řízené snížení objemu tekutin (hemodialýza ultrafiltrací) se užívá, pokud vysoké dávky atropinu dostatečně neovlivní hypersekreci plicní. Výměnná transfuze se používá u pacientů, kde přetrvávají projevy závažné intoxikace [20].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 SYNTETICKÁ ČÁST

3.1.1 Obecná syntetická část

Rozpouštědla (aceton, DMF, MeCN) a chemikálie byly dodány od firem Fluka a Sigma-Aldrich a použity bez dalšího přečištění. Reakce byly monitorovány pomocí TLC (DC-Alufolien Cellulose F, Merck, Německo) s použitím soustavy BuOH-CH₃COOH-H₂O 5:1:2 a detekovány Dragendorfovým činidlem. Teploty tání byly měřeny na bodotávku PHMK 05 (VEB Kombinat Nagema, Radebeul) a nejsou korigovány.

NMR spektra byla měřena na Varian Gemini 300 (¹H 300 MHz, ¹³C 75 MHz, Palo Alto CA, USA). Chemické posuny pro ¹H i ¹³C spektra jsou uvedeny v ppm (δ) v poměru k signálu rozpouštědla DMSO (δ 2.50 pro ¹H; δ 39.43 pro ¹³C). Signály jsou uvedeny jako s (singlet), d (dublet), t (triplet) a m (multiplet).

Elementární analýza byla provedena na přístroji EA 1110 CHNS instrument (CE Instruments, Milano, Italy).

ESI-MS spektra byla měřena s použitím vysokotlaké kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. HP1100 HPLC systém byl dodán z Agilent Technologies (Waldbronn, Německo). Skládá se z vakuového zplynovače G1322A, kvarterní pumpy G1311A, autosampleru G1313A a kvadrupólového hmotnostního spektrometru MSD1456 VL vybaveného zdrojem elektropray-ionizace. Dusík pro hmotnostní spektrometr byl získán z dusíkového generátoru Whatman 75-720. Data byla odečtena v pozitivním iontovém módu s ESI sondou o napětí 4000 V. Tlak rozprašovaného plynu byl ustaven na 35 psig. Teplota sušícího plynu byla 335 °C a průtok 13 l/min.

3.1.2 Příprava monokvarterní soli

4-hydroxyiminomethylpyridin (**1**; 45.0 g; 32.8 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (30 ml) a byl přidán 1,4-dibromobutan (19.32 ml; 163.8 mmol). Směs byla zahřívána při refluxu acetonu po dobu 9 hodin a poté ochlazena na l.t. Surový produkt byl odfiltrován za sníženého tlaku a rekrystalován v MeCN (Schéma 1).

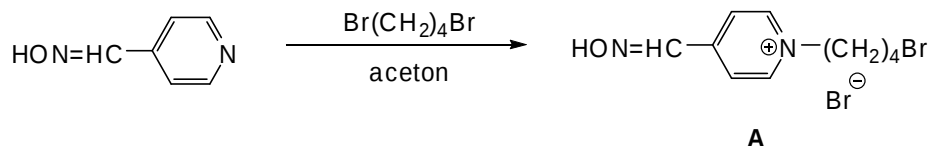
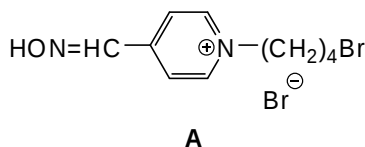


Schéma 1 Příprava 1-(4-bromobutyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium bromidu.

1-(4-bromobutyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium bromid (**1**) Výtěžek 70%. T.t. 146-149°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.08 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz, H-2,6), 8.44 (s, 1H, -CH=NOH), 8.25 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz, H-3,4), 4.64 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, N-CH₂-), 3.57 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz, Br-CH₂-), 2.11-1.96 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-), 1.89-1.76 2.11-1.96 (m, 2H, Br-CH₂-CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 148.33, 145.05, 124.07, 59.25, 33.98, 29.34, 28.58. EA: vypočítáno 35.51% C, 4.33% H, 8.43% N; nalezeno 35.53% C, 4.17% H, 8.29% N. ESI-MS: *m/z* 256.9 [M]⁺ (vypočítáno [C₁₀H₁₄BrN₂O]⁺ 257.03).



3.1.3 Příprava biskvarterních solí

1-(4-bromobutyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium bromid (**A**; 0.5 g; 1.5 mmol) byl rozpuštěn v DMF (10 ml) nebo MeCN (30 ml) společně s odpovídajícím pyridinovým derivátem (3.0 mmol). Směs byla zahřívána při 70-100°C po dobu 2.5-23 hodin a poté ochlazená na l.t.. K reakční směsi byl přidán nadbytek acetonu (50 ml) a byla uchována v chladicím boxu přes noc. Surový pevný produkt byl dekantován, kapalná část reakční směsi odlita, surový produkt převrstven MeCN (50 ml) a ponechán při l.t. přes noc. Surový produkt byl filtrován za sníženého tlaku a rekrystalován z MeCN (Schéma 2).

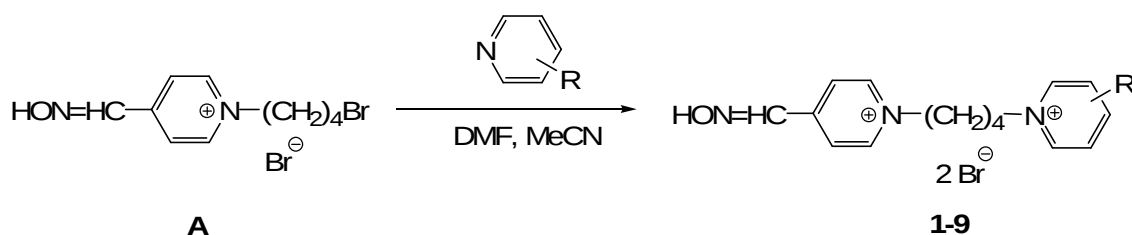
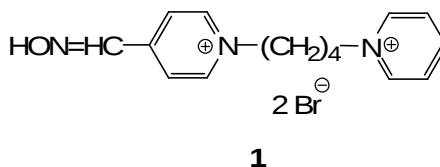


Schéma 2 Obecná příprava biskvarterních reaktivátorů acetylcholinesterasy.

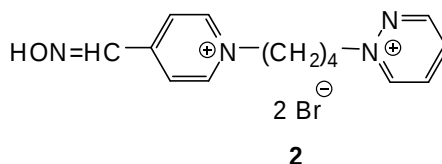
3.1.3.1 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-pyridinium-butan dibromid (1)

Reakce probíhala v DMF při 100°C a byla ukončena po 7 h. Výtěžek 48%. T.t. 243-244°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.18 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-2,6), 9.12 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-2',6'), 8.67-8.59 (m, 1H, H-4'), 8.46 (s, 1H, -CH=NOH), 8.25 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-3,5), 8.22-8.15 (m, 2H, H-3',5'), 4.80-4.62 (m, 4H, N-CH₂-), 1.97 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.30, 145.53, 145.01, 144.98, 144.75, 128.05, 124.00, 59.63, 59.19, 27.06, 26.95. EA: vypočítáno 43.19% C, 4.59% H, 10.07% N; nalezeno 43.29% C, 4.75% H, 10.08% N. ESI-MS: m/z 128.6 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno $[\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}/2]^{2+}$ 128.58).



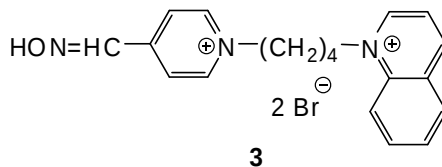
3.1.3.2 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-pyridazinium-butan dibromid (2)

Reakce probíhala v DMF při 100°C a byla ukončena po 2 h. Výtěžek 71%. T.t. 222-224°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 10.05 (d, 1H, $J = 5.8$ Hz, H-6'), 9.65 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, H-3'), 9.11 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-2,6), 8.80-8.73 (m, 1H, H-4'), 8.67-8.60 (m, 1H, H-5'), 8.45 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 8.26 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3,5), 4.91 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, N'- CH_2 -), 4.68 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, N- CH_2 -), 2.10-1.96 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 154.47, 150.12, 148.34, 145.03, 136.58, 136.01, 124.00, 63.44, 59.23, 26.98, 25.73. EA: vypočítáno 40.21% C, 4.34% H, 13.40% N; nalezeno 40.09% C, 4.49% H, 13.27% N. ESI-MS: m/z 129.1 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno $[\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}/2]^{2+}$ 129.08).



3.1.3.3 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-chinolinium-butan dibromid (3)

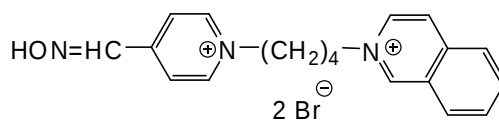
Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 31 h. Výtěžek 21%. T.t. 177-179°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.68 (d, 1H, $J = 5.8$ Hz, H-2'), 9.34 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H-8'), 9.12 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-2,6), 8.71 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H-4'), 8.53 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 8.45 (s, 1H, -CH=NOH), 8.33-8.17 (m, 4H, H-3,3',5,7'), 8.11-8.02 (m, 1H, H-6'), 5.17 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, N'-CH₂-), 4.71 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, N-CH₂-), 2.20-1.93 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 149.71, 148.29, 47.41, 145.01, 137.33, 135.58, 130.70, 129.81, 129.66, 123.99, 122.16, 119.00, 59.33, 58.35, 27.36, 25.88. EA: vypočítáno 48.85% C, 4.53% H, 8.99% N; nalezeno 47.41% C, 4.63% H, 9.06% N. ESI-MS: m/z 153.6 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno $[\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}/2]^{2+}$ 153.59).



3.1.3.4 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-isochinolinium-butan dibromid

(4)

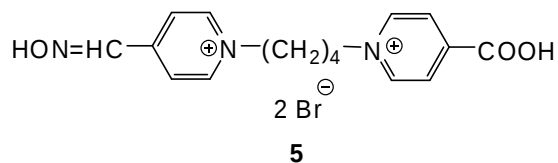
Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 11 h. Výtěžek 26%. T.t. 205-206°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 10.26 (s, 1H, H-1'), 9.12 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-2,6), 8.87 (d, 1H, $J = 6.7$ Hz, H-3'), 8.64 (d, 1H, $J = 6.7$ Hz, H-4'), 8.51 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-8'), 8.44 (s, 1H, -CH=NOH), 8.38 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 8.32-8.21 (m, 3H, H-3,5,7'), 8.12-8.04 (m, 1H, 6'), 4.83 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, N-CH₂-), 4.70 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, N'-CH₂-), 2.18-1.94 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 150.08, 148.30, 145.02, 136.92, 136.82, 134.85, 131.09, 130.33, 127.19, 127.13, 125.80, 124.99, 59.67, 59.29, 27.03, 26.81. EA: vypočítáno 48.85% C, 4.53% H, 8.99% N; nalezeno 48.13% C, 4.75% H, 8.78% N. ESI-MS: m/z 153.6 $[\text{M}]^{2+}$ (vypočítáno $[\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}]^{2+}$ 153.59).



4

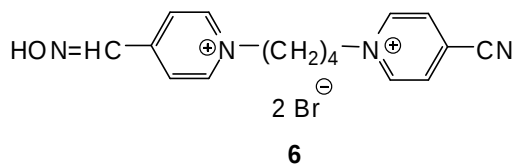
3.1.3.5 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-karboxypyridinium)-butan dibromid (5)

Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 31.75 h. Výtěžek 51%. T.t. rozklad při 230°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.33 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-2,6), 9.12 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-2',6'), 8.48 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3,5), 8.45 (s, 1H, -CH=NOH), 8.25 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3',5'), 4.88-4.62 (m, 4H, N-CH₂-, N'-CH₂-), 2.06-1.90 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 163.53, 148.33, 146.15, 145.37, 145.02, 127.28, 124.00, 60.00, 59.19, 27.08, 26.89. EA: vypočítáno 41.67% C, 4.15% H, 9.11% N; nalezeno 42.34% C, 4.40% H, 9.24% N. ESI-MS: m/z 150.6 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno $[\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3/2]^{2+}$ 150.57).



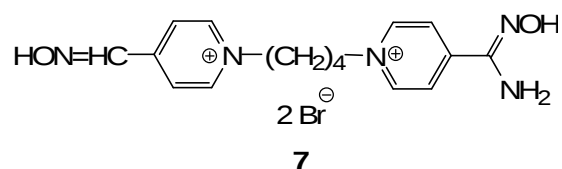
3.1.3.6 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-karbonitrilpyridinium) butan dibromid (6)

Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 15.5 h. Výtěžek 21%. T.t. 247-249°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.50 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-2,6), 9.12 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-2',6'), 8.76 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-3,5), 8.45 (s, 1H, -CH=NOH), 8.25 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3',5'), 4.89-4.59 (m, 4H, N-CH₂-, N'-CH₂-), 2.10-1.88 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.32, 146.23, 145.00, 130.96, 126.79, 124.06, 114.76, 60.60, 59.11, 26.90, 26.78. EA: vypočítáno 43.46% C, 4.10% H, 12.67% N; nalezeno 43.16% C, 4.26% H, 12.51% N. ESI-MS: m/z 141.1 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno $[\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}/2]^{2+}$ 141.08).



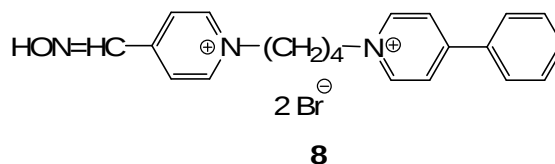
3.1.3.7 1-[4-(1-aminohydroxyiminomethyl)-pyridinium]-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-butan dibromid (7)

Reakce probíhala v DMF při 100°C a byla ukončena po 7 h. Výtěžek 51%. T.t. 258°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.15-9.07 (m, 4H, H-2, 2',6,6'), 8.45 (s, 1H, -CH=NOH), 8.33 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-3,5), 8.25 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3',5'), 6.46 (s, 2H, -NH₂), 4.72-4.61 (m, 4H, N-CH₂-, N'-CH₂-), 2.02-1.91 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.31, 147.77, 146.92, 145.03, 144.99, 144.55, 124.01, 122.71, 59.23, 59.09, 26.94, 26.88. EA: vypočítáno 40.44% C, 4.45% H, 14.74% N; nalezeno 40.57% C, 4.62% H, 14.63% N. ESI-MS: m/z 157.6 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno $[\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2/2]^{2+}$ 157.59).



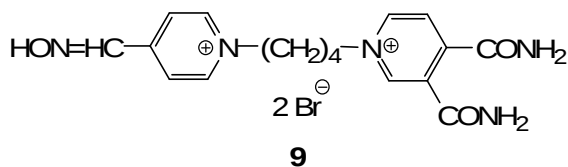
3.1.3.8 1-(4-fenylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-butan dibromid (8)

Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 14.5 h. Výtěžek 45%. T.t. rozklad při 236-238°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.19 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-2,6), 9.12 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-2',6'), 8.56 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-3,5), 8.46 (s, 1H, -CH=NOH), 8.26 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-3',5'), 8.14-8.07 (m, 2H, Ph), 7.69-7.62 (m, 3H, Ph), 4.79-4.61 (m, 4H, N-CH₂-, N'-CH₂-), 2.10-1.94 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 154.61, 148.32, 145.03, 144.79, 133.43, 132.09, 129.63, 128.07, 124.45, 124.02, 59.27, 58.81, 27.01, 26.98. EA: vypočítáno 51.14% C, 4.70% H, 8.52% N; nalezeno 50.92% C, 4.96% H, 8.08% N. ESI-MS: m/z 166.6 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno $[\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}/2]^{2+}$ 166.59).



3.1.3.9 1-(3,4-dikarbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-butan dibromid (9)

Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 31 h. Výtěžek 59%. T.t. rozklad při 191-193°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.50-9.26 (m, 2H, H-2',6'), 9.13 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-2,6), 8.51-8.33 (m, 3H, $-\text{CH}=\text{NOH}$, H-3,5), 8.31-8.03 (m, 5H, $-\text{CONH}_2$, H-5'), 4.86-4.61 (m, 4H, N- CH_2 -, N'- CH_2 -), 2.16-1.88 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 165.71, 164.01, 150.72, 148.60, 146.41, 145.43, 144.67, 134.39, 126.33, 124.30, 60.17, 59.48, 27.22, 27.09. EA: vypočítáno 40.58% C, 4.21% H, 13.92% N; nalezeno 40.34% C, 4.35% H, 13.46% N. ESI-MS: m/z 171.6 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno $[\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3/2]^{2+}$ 171.58).



3.2 STANOVENÍ REAKTIVAČNÍCH PARAMETRŮ POTENCIOSTATICKOU METODOU IN VITRO

3.2.1 Princip metody

Enzym acetylcholinesteraza (AChE) štěpí substrát, acetylcholinjodid (AChI), za vzniku cholinu (Ch) a kyseliny octové (Schéma 3).

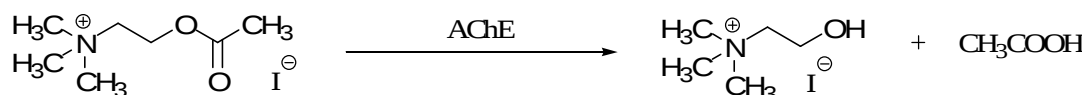


Schéma 3 Enzymatická přeměna acetylcholinu.

Při reakci AChE s OFI dochází k ireversibilní inhibici AChE (Schéma 4).

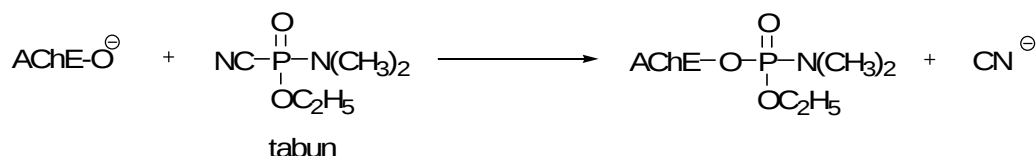


Schéma 4 Ireverzibilní inhibice acetylcholinesterazy tabunem.

Reakcí inhibované AChE s oximátovým anionem dochází k reaktivaci enzymu (Schéma 5).

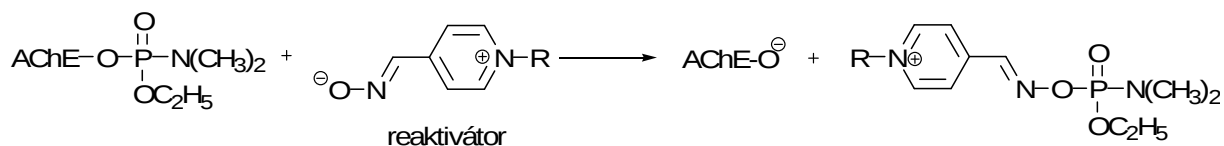


Schéma 5 Reaktivace acetylcholinesterazy inhibované tabunem.

Při potenciostatickém měření je roztokem NaOH titrována uvolněná kyselina octová. Ze spotřeby NaOH je možné určit aktivitu AChE (a_0), inhibované AChE (a_i) a reaktivované AChE (a_r).

3.2.2 Postup měření

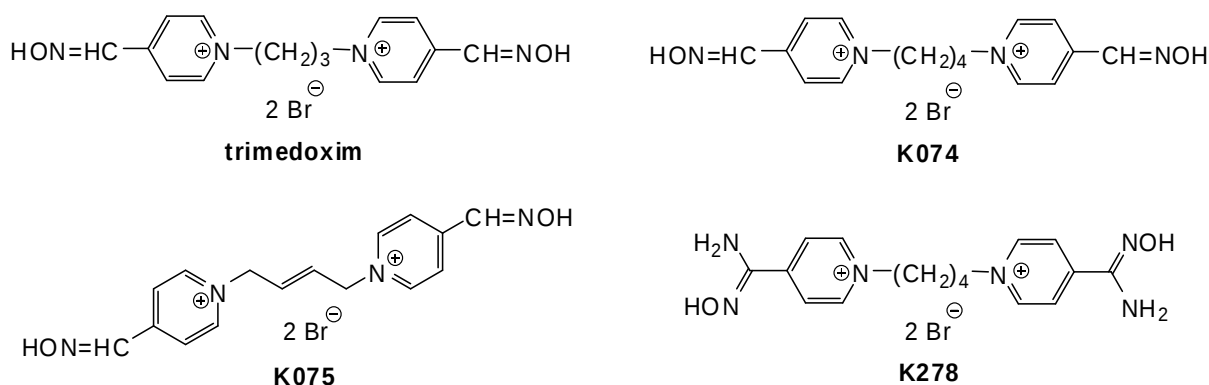
Homogenát z mozků laboratorního potkana (10% ve vodě; 0.5 ml) byl smíchán s isopropylalkoholovým roztokem OFI (20 μ l), destilovanou vodou (0.5 ml) a inkubován ve zkumavce za teploty 25 °C po dobu 30 minut (pH 7.6). Inkubovaná směs byla přelita do roztoku chloridu sodného (3 M; 2.5 ml) a destilované vody (18.5 ml), zkumavka byla vypláchnuta destilovanou vodou (1 ml). Nakonec byl přidán roztok acetylcholinjodidu (0.02 M; 2 ml). Enzymová aktivita byla měřena při pH 8.0 a teplotě 25 °C na autotitrátoru Titrando 842 (Metrohm, Švýcarsko). Aktivita intaktního (a_0) a inhibovaného enzymu (a_i) byly odečteny ze závislosti spotřeby roztoku NaOH (0.01 M) na čase.

V případě reaktivace inhibované AChE byla směs inkubována dalších 10 minut s roztokem reaktivátoru (10^{-3} M nebo 10^{-5} M; 0.2 ml) a destilovanou vodou (0.8 ml). Poté byla inkubovaná směs přelita do roztoku chloridu sodného (3 M; 2.5 ml) a destilované vody (17.5 ml), zkumavka byla vypláchnuta destilovanou vodou (1 ml). Byl přidán roztok acetylcholinjodidu (0.02 M; 2 ml) a aktivita reaktivované AChE (a_r) byla opět odečtena ze závislosti spotřeby NaOH na čase. Účinnost daného reaktivátoru *in vitro* byla vypočítána podle vzorce:

$$x = \left(1 - \frac{a_0 - a_r}{a_0 - a_i} \right) \cdot 100 \quad [\%]$$

3.2.3 Výsledky měření *in vitro*

Všechny reaktivátory AChE byly testovány *in vitro* při dvou koncentracích (10^{-3} M nebo 10^{-5} M). Jako OFI byla zvolena NPL tabun a pesticid paraoxon. Jako srovnávací reaktivátory byly zvoleny sloučeniny trimedoxim, K074, K075 a K278 (Obr. 3). Průměrné výsledky tří na sobě nezávislých *in vitro* měření pro každý reaktivátor jsou uvedeny v Tabulce 2.



Obr. 3 Znamé reaktivátory acetylcholinesterazy vybrané jako srovnávací sloučeniny.

Inhibitor	Reaktivace (%)			
	tabun		paraoxon	
	10 ⁻³ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁵ M
Reaktivátor/Koncentrace				
trimedoxim	41 ± 1	6 ± 0	70 ± 0	56 ± 0
K074	46 ± 1	15 ± 0	53 ± 0	40 ± 0
K075	42 ± 1	19 ± 0	54 ± 0	41 ± 0
K278	2 ± 1	1 ± 0	0	0
1	4 ± 0	1 ± 0	60 ± 1	28 ± 2
2	1 ± 0	0	16 ± 0	1 ± 0
3	0	0	0	14 ± 0
4	0	5 ± 1	23 ± 2	64 ± 0
5	4 ± 0	0	38 ± 2	79 ± 3
6	0	0	29 ± 2	25 ± 2
7	0	6 ± 1	41 ± 1	25 ± 1
8	0	0	15 ± 2	12 ± 2
9	0	0	6 ± 0	0

Tab. 1 Výsledky reaktivace testovaných sloučenin (%; průměrná hodnota tří nezávislých měření).

3.2.4 Hodnocení výsledků

Výsledky charakterizují reaktivační proces (%) nově připravených oximů (Tab. 2). Bylo hodnoceno devět nových látek ve srovnávání se čtyřmi známými reaktivátory acetylcholinesterazy (Obr. 3). Reaktivátory byly hodnoceny in vitro ve dvou koncentracích (10^{-3} M nebo 10^{-5} M). Pro praktické využití in vivo je vhodnější pro reaktivaci koncentrace 10^{-5} M. Každá látka byla hodnocena na NPL tabunu a pesticidu paraoxon.

Z výsledků získaných při testování účinnosti reaktivátorů na tabunu lze říci, že ani jedna ze získaných látek v testovaných koncentracích není vhodná pro využití při léčbě intoxikací tabunem ve srovnání s účinností již známých reaktivátorů, které mají schopnost reaktivovat inhibovanou AChE.

Výsledky reaktivace testovaných sloučenin byly úspěšnější při inhibici AChE paraoxonem. Při koncentraci 10^{-3} M se jeví jako nejúčinnější vzorek č. 1, kde schopnost reaktivace dosahuje 60 %. V porovnání se srovnávacími látkami je nový oxim úspěšnější než K074, K075 a K275, ale méně účinný než reaktivátor trimedoxim. Z dalších sloučenin je vhodná látka č. 7 dosahující reaktivace přes 40 %. Její účinnost však nedosahuje takových schopností jako mají srovnávací látky. Největšího úspěchu bylo dosaženo v koncentraci 10^{-5} M. Látka č.5 (79 %) se jeví jako nejvíce účinná v reaktivaci. Její procentuální reaktivační schopnost je vyšší než u srovnávacích látek, kde nejúčinnějším reaktivátorem byl trimedoxim. K dalším reaktivačně účinným látkám, patří sloučenina č. 4, dosahující reaktivační schopnosti v 64 %. I ta dosáhla lepšího účinku než trimedoxim. Ostatní sloučeniny nedosáhly vyšší schopnosti reaktivovat inhibovaný enzym než je hodnota 30 %.

Závěrem lze shrnout, že nově vyvinuté oximy, zvláště oxim č.4 a 5, při fyziologické koncentraci (10^{-5} M), jsou účinnými reaktivátory AChE inhibované paraoxonem. Díky tomuto výsledku bylo dosaženo požadovaného cíle celé této práce.

ZÁVĚR

Celá práce byla založena na prvotní studii dané problematiky a následné práci v laboratoři na katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví UO v Hradci Králové pod odborným vedením.

Teoretická část je zaměřena na problematiku organofosforových pesticidů, s kterými se nejvíce setkáváme při jejich využití v zemědělském odvětví. Vzhledem k tomu, že některé OF pesticidy se vyznačují značnou toxicitou a mohou poškodit lidský organismus, je nutné v rámci prevence a terapie připravit látky, které budou účinně blokovat jejich působení v organismu. Látky, které se v terapii OF intoxikací užívají, se nazývají reaktivátory acetylcholinesterazy. Dosud ale nebyl připraven reaktivátor AChE, který by byl účinný při všech typech otrav OF. Práce obsahuje teoretické zpracování zmíněné problematiky za využití dostupné literatury.

Experimentální část diplomové práce probíhala v laboratoři. Cílem byla příprava nových reaktivátorů (oximů) a jejich hodnocení v možnosti dalšího terapeutického využití. Výsledkem experimentální části práce byla příprava devíti nových látek, které se dále testovaly při různé koncentraci a následně se podrobily další analýze. Ze získaných výsledků byla vyhodnocena jejich reaktivační úspěšnost, která je sumárně uvedena v tabulce č.2. Nové reaktivátory nebyly účinné proti NPL tabunu v porovnání s reaktivátory srovnávacími, ale dvě sloučeniny byly schopny překonat reaktivátory srovnávací při inhibici AChE paraoxonem. Protože by bylo velmi náročné studovat účinnost všech devíti oximů na více pesticidních látkách, byl v experimentu použit modelově pesticid z řady organofosfátů (paraoxon).

SEZNAM LITERATURY

- 1) BAJGAR, J. *Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1985. ISBN 08-071-85
- 2) BAJGAR, J.; FUSEK, J.; HRDINA, V. *Vojenská toxikologie*. 1. vyd. Hradec Králové: VLAJEP, 1991. s.20-55
- 3) BENEŠ, V.; ŠRÁM, R. *Pesticídy – prevencia otráv a prvá pomoc*. 1. vyd. Bratislava: Technicko-informační služba – OOP chemické závody J. Dimitrova, 1968
- 4) CREMLYN, R. *Pesticidy*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1985. ISBN 04-625-85
- 5) COKUGRAS, N. (2003): Turk. J. Biochem. 28; s. 54-61
- 6) EYER, P.; SZINICZ, L; THIERMAN, H.; WOREK, F.; ZILKER, T. (2007): Toxicology 233; s. 108-119
- 7) HARTL, J. a kol. *Farmaceutická chemie II/1*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1997; s. 42-53
- 8) JAKONOVIĆ, M.; STOJILKOVIĆ, M. P. (2006): Eur. J. Pharmacol. 553; s. 10-17
- 9) KASSA, J. 2002. *Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents*. J. Clin. Toxicol. 40; s. 803-816
- 10) KUČA, K; KASSA, J. (2004): Vet. Hum. Toxicol. 46; s. 15-18
- 11) LEUZINGER, W. *The number of catalytic sites in acetylcholinesterase*. Biochem. J., 1971. 123; s. 139-141
- 12) LULLMAN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004; s. 92-93, 573-576
- 13) MASSOULIE, J.; SUSSMAN, J.; STILMAN, I. *Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase*. Prog. Brain Res. 1993. 98; s. 139-146
- 14) MELNIKOV, N. N. *Chemistry of pesticides*. New York: Spring-Verlog, 1971, 480
- 15) NIKONOROW, M. a kol. *Pesticídy a toxicita*. 1. vyd. Bratislava: Příroda, 1983. ISBN 508-21-85
- 16) PATOČKA, J. a kol. *Vojenská toxikologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publisching, a. s., 2004. ISBN 80-247-0608-3
- 17) PATOČKA, J.; KUČA, K.; JUN, D. (2002): Acta Med. 47; s. 215-228
- 18) RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Pharmacology*. Churchill Livingstone, 2003. s. 155-160
- 19) SCHREIBER, M. a kol. *Funkční somatologie*. 1. vyd. Praha: H & H, 1998. ISBN 80-86022-28-5

- 20) ŠEVELA, K.; ŠEVČÍK, P.; KRAUS, R. a kol. Akutní intoxikace i intenzivní medicíně. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a. s., 2002. ISBN 80-7169-843-1
- 21) SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, CH.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo Californica: an acetylcholine-binding protein. Science, 1991. 253; s. 872-879
- 22) THIERMAN, H; SZINICZ, L.; EYER, P.; FELGENHAUER, A.; ZILKER, T.; WOREK, F. (2007). Toxikology 233; s. 145-154
- 23) VOPRŠALOVÁ, M.; ŽÁČKOVÁ, P. Základy toxikologie pro farmaceuty. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2000. s. 144-152
- 24) WAISSER, K. Biologicky aktivní organické látky. 1. vyd. Hradec Králové: Gaudeamus, 2006. ISBN 80-7041-092-2