

**UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2008

Bc. Kateřina Cvernová

**Univerzita Pardubice
Fakulta zdravotnických studií**

**In vitro reaktivace butyrylcholinesterázy inhibované organofosforovými
inhibitory cholinesteráz**

Bc. Kateřina Cvernová

**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. Kateřina CVERNOVÁ**

Studijní program: **N5341 Ošetrovatelství**

Studijní obor: **Ošetrovatelství**

Název tématu: **In vitro reaktivace butyrylcholinesterázy inhibované organofosforovými inhibitory cholinesteráz**

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

1. Zpracování záměru (tématu) práce
2. Studium literatury, rešerše
3. Vypracování osnovy práce
4. Empirická šetření
5. Vypracování teoretické části práce (práce s literaturou)
6. Interpretace výsledků (zpracování empirické části práce)
7. Korektury a typografické úpravy

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: **50 stran**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

LULLMANN, H. Farmakologie a toxikologie. 15. vyd. Praha:Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1

PATOČKA, J. Vojenská toxikologie. 1. vyd. Praha:Grada, 2004. ISBN 80-247-0608-3

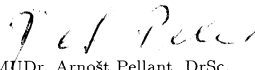
FUSEK, J. et al. Vojenská toxikologie. Hradec Králové: Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně, 1991. ISBN 80-85109-36-0

KASSA, J. et al. Toxikologické aspekty medicíny katastrof. 1. vyd. Hradec Králové: Univerzita obrany, 2006. ISBN 80-85109-89-1


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

Stěžejním důsledkem expozice organofosfáty je inhibice neuronální acetylcholinesterázy. K profylaxi otrav je možné substitučně použít enzym butyrylcholinesterázu. Ekonomicky výhodnou strategií je i reaktivace tohoto již inhibovaného enzymu.

KLÍČOVÁ SLOVA

butyrylcholinesteráza; acetylcholinesteráza; inhibice; organofosfáty; otrava; reaktivace

TITLE

In vitro reactivation of butyrylcholinesterase inhibited by organophosphorus inhibitors of cholinesterases

ABSTRACT

Inhibition of neuronal acetylcholinesterase is the most important effect of organophosphate exposure. Enzyme of butyrylcholinesterase is possible to use to profylaxis of poisoning. Economically profitable strategy is also reactivation of this inhibited enzyme.

KEYWORDS

butyrylcholinesterase; acetylcholinesterase; inhibition; organophosphates; poisoning; reactivation

Poděkování

V úvodu bych ráda poděkovala Prof. MUDr Josefu Fuskovi, DrSc a kpt. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při vypracování diplomové práce. Poděkování patří též slečně Mgr. Lucii Musilové za pomoc při provádění výzkumné části diplomové práce.

1. Obsah

1. OBSAH	6
2. ÚVOD	9
3. CÍL PRÁCE	11
4. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
4.1. PŘENOS NERVOVÉHO VZRUCHU NA SYNAPSÍCH.....	14
4.1.1. Cholinergní přenos.....	14
4.1.2 Cholinesterázy.....	15
4.2. INHIBITORY CHOLINESTERÁZ.....	18
4.3. ORGANOFOSFÁTY	19
4.3.1. Struktura a fyzikálně chemické vlastnosti OF	20
4.3.2. Osud v organismu.....	22
4.3.3 Mechanismus toxického účinku, dealkylace	23
4.3.4. Klinický obraz akutní intoxikace	24
4.3.5. Chronické otravy.....	26
4.3.6. Diagnostika, terapie	26
4.3.7. Prevence intoxikace; farmakologická profylaxe	29
4.4. KARBAMÁTY.....	31
4.4.1. Struktura karbamátů.....	31
4.4.2. Osud v organismu.....	31
4.4.3. Mechanismus toxického účinku.....	31
4.4.4. Intoxikace	32
4.4.5. Terapie	32
4.5. LÉČEBNÉ VYUŽITÍ INHIBITORŮ CHOLINESTERÁZ	32
4.5.1. Využití inhibitorů ChE při léčbě Alzheimerovy demence	33
4.6. REAKTIVÁTORY CHOLINESTERÁZ.....	35
4.7. KLINICKÝ VÝZNAM STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERÁZ	36
4.7.1. Měření aktivity enzymu.....	37
4.8. STRATEGIE VYUŽITÍ BUChE JAKO PROFYLAKTIKA PŘI EXPOZICI OF LÁTEK	38
5. PRAKTICKÁ ČÁST	40
5.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	42
5.2. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	43
5.2.1. Příprava fosfátového pufru	43
5.2.2. Příprava vzorků.....	43
5.2.3. Příprava substrátu.....	43
5.2.4. Příprava činidla	43
5.2.5. Příprava inhibitorů	44
5.2.6. Příprava reaktivátorů.....	44
5.3. POUŽITÝ MATERIÁL	47
5.4. PODMÍNKY MĚŘENÍ.....	47
5.5. POSTUPY MĚŘENÍ.....	47
5.5.1. Měření kinetiky inhibice enzymu pesticidy methamidophos	47
a leptophos-oxon	47
5.5.2. Stanovení hodnot IC_{50}	48
5.5.3. Zkoumání reaktivační schopnosti jednotlivých reaktivátorů.....	49
5.5.4. Pracovní postup pro reaktivaci BuChE inhibované organofosfáty leptophos-oxon a methamidophos	50
5.6. ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT	52
6. VÝSLEDKY	53
6.1. VÝSLEDKY KINETIKY INHIBICE, ZJIŠTĚNÉ HODNOTY $T_{1/2}$	54
6.2. ZJIŠTĚNÉ HODNOTY IC_{50}	58
6.3. VÝSLEDKY REAKTIVAČNÍ ÚČINNOSTI TESTOVANÝCH REAKTIVÁTORŮ.....	62
7. DISKUSE A ZÁVĚR.....	66

Seznam použitých zkratek:

AČR	armáda české republiky
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
ATP	adenosintrifosfát
AD	Alzheimerova demence
BuCh	butyrylcholin
BuChE	butyrylcholinesterasa
BuCh	butyrylcholin
CNS	centrální nervová soustava
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
GIT	gastrointestinální trakt
ChE	cholinesterasa
IPR	isopropylalkohol
NPL	bojové látky s nervově paralytickým účinkem
OF	organofosforový, organofosfát(y)
OFI	OF inhibitor
PNS	periferní nervový systém
PB	0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4

2. Úvod

Organofosforové sloučeniny, používané jako pesticidy a NPL, jsou vysoce toxické látky, které v lidském organismu inhibují enzymy AChE a BuChE. Z klinického hlediska má větší význam inhibice AChE. V důsledku její inaktivace dochází v lidském těle ke kumulaci ACh s následnou stimulací cholinergních receptorů. Výsledným stavem je cholinergní krize, která může vést k trvalým následkům, v horším případě ke smrti.

Široká dostupnost OF v oblasti průmyslu, vysoké procento používání OF pesticidních přípravků a stále aktuální hrozba teroristického zneužití OF dávají podnět k novému vývoji účinnějších antidot. Mezi doposud užívanou antidotní terapii patří anticholinergní (symptomatická) a reaktivační (kauzální) léčba. Reaktivační léčba sestává z látek schopných reaktivovat inhibovaný enzym, tzv. reaktivátorů. Ačkoliv se reaktivátory používají již více jak půl století, doposud nebyl vyvinut reaktivátor, který by dokázal účinně působit proti všem OF. Novou potencionální strategií by se mohla stát BuChE, jež by se využívala jako scavenger při otravách OF, ať už z profylaktického či terapeutického hlediska. Tohoto enzymu je však v krvi příliš málo na to, aby dokázal člověka ochránit před případnou intoxikací OF. Řešením by bylo podání enzymu z vhodného zdroje. Jednou z možností zvýšení účinnosti takto podávané BuChE je její reaktivace pomocí reaktivátorů, kdy by byl enzym kontinuálně reaktivován reaktivátorem přítomným v krevním oběhu. Z hlediska mechanismu by se pak jednalo o tzv. pseudokatalytický bioscavenger. Tento přístup by umožnil snížit množství podávaného enzymu.

Součástí této diplomové práce je testování reaktivační účinnosti vybraných reaktivátorů BuChE inhibované OF pesticidy methamidophos a leptophos-oxon. Poznatky získané v této práci budou využity při hledání optimální terapie otrav způsobených OF NPL a pesticidy Katedrou toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové.

3. Cíl práce

Cílem této práce bylo:

- Charakterizovat OFI methamidophos a leptophos-oxon z hlediska jejich inhibičních vlastností vůči lidské plazmatické BuChE (stanovení poločasů inhibice a hodnot IC_{50}).
- u třidvaceti vybraných reaktivátorů navržených jako antidota při otravách NPL, OF a karbamátovými pesticidy, zjistit jejich *in vitro* reaktivační účinnost u lidské plazmatické BuChE inhibované vybranými, výše uvedenými OF látkami.

4. Teoretická část

4.1. Přenos nervového vzruchu na synapsích

Na synapsích (specifické spojení dvou neuronů, případně neuronu a svalového vlákna) se přenos informace realizuje pomocí chemických látek, tzv. neurotransmiterů (mediátorů), které jsou nashromážděny v synaptických váčcích. Působením vzruchu se z vezikul uvnitř synaptického váčku tento neurotransmiter uvolňuje do synaptické štěrbině a difuzí se transportuje k postsynaptické membráně. V této membráně se váže na specifické receptory a tím mění membránový potenciál cílového neuronu. Dle charakteru molekuly mediátoru působí na daný neuron buď excitačně nebo inhibičně. (1, 2)

Uvolněné mediátory jsou ihned rozkládány souběžně uvolňovanými či přítomnými enzymy, popř. jsou zachytávány gliovými buňkami či zpětně vstřebávány. Díky tomuto mechanismu může proběhnout velmi rychle další přenos informace s novým uvolněním mediátoru. Tento cyklus je velmi rychlý (až 1000 cyklů/min.).

Vedle acetylcholinu patří mezi nejznámější přenašeče také dopamin, adrenalin, noradrenalin, serotonin, glutamát, kyselina γ -aminomáselná, histamin, aspartát, glycin a neuropeptidy. (2)

4.1.1. Cholinergní přenos

Synapse, v nichž se realizuje přenos pomocí acetylcholinu (ACh), se označují jako cholinergní. ACh je syntetizován z exogenně dodávaného cholinu (potravou) a aktivovaného acetátu (acetylkoenzym A) za přítomnosti enzymu cholinacetylázy. Po syntéze je ACh ve vysokých koncentracích skladován v synaptických váčcích, z nichž se působením vzruchové aktivity za spoluúčasti iontů Ca^{2+} uvolňuje a difunduje synaptickou štěrbinou k postsynaptické membráně a váže na integrální bílkovinu – cholinergní receptor. Ten se nachází jednak ve vegetativních gangliích, jednak v orgánech inervovaných parasympatikem (srdce, hladká svalovina oka, močovodu, bronchů, cév a trávicího ústrojí, včetně slinných, slzných a potních (inervovaných sympatikem) žláz. Existují dva hlavní typy receptorů pro ACh: nikotinové (N) a muskarinové (M), přičemž oba disponují různými podtypy v závislosti na lokalizaci a způsobu přenosu signálu, popř. jejich afinitě k ligandům. Pro N-cholinergní receptory jsou to podtypy N_N , nacházející se ve vegetativních gangliích a N_M na nervosvalové ploténce; pro M-cholinergní receptory pak podtypy M_1 , které se vyskytují ve vegetativních gangliích, v CNS a v buňkách exokrinních žláz, M_2 v srdci a M_3 v hladké svalovině.

Interakcí ACh s receptorem se mění prostorové uspořádání postsynaptické membrány a vzniká tzv. ionofor (pór). Tímto ionoforem začnou dle koncentračního spádu proudit ionty (K^+ , Na^+) a vzniklý elektrický potenciál se dále šíří po nervovém vlákne jako elektrický impuls. (1, 3, 6, 26)

Uvolněný ACh působí jen krátce (cca 2 ms), neboť je okamžitě eliminován několika způsoby. Po navázání na receptor je jeho větší část hydrolyzována enzymy acetylcholinesterázou, méně pak butyrylcholinesterázou, na cholin a acetát, zbytek ACh je zpětně vstřebáván presynaptickými zakončeními. Po rozložení ACh se receptor vrací do původního stavu, ionofor membrány se uzavírá a dochází k obnovení původních iontových poměrů za dodání energie ve formě ATP. (1, 3, 6, 25) Cílové efekty podráždění parasymptatiku jsou uvedeny v tab.1

Tab. 1 Cílové efekty podráždění parasymptatiku

<i>mozek</i>	neklid, úzkost, křeče, zúžení, mióza
<i>oko</i>	mióza
<i>průdušky</i>	konstrikce
<i>sliny</i>	↑ sekrece
<i>žaludek, střevo</i>	↑ peristaltiky a sekrece
<i>srdce</i>	negativní chromotropní, dromotropní účinek
<i>cévy</i>	vazodilatace
<i>kosterní sval</i>	kontrakce, stah svalu
<i>žlučník</i>	stah

4.1.2 Cholinesterázy

ChE patří jsou enzymy patřící do skupiny hydroláz štěpících esterovou vazbu, čili patří do podskupiny esteráz. ChE hydrolyzují estery cholinu. Podle své afinity k přirozenému substrátu ACh se ChE dělí na dvě základní skupiny: acetylcholinesterázu (AChE) a butyrylcholinesterázu (BuChE). (4)

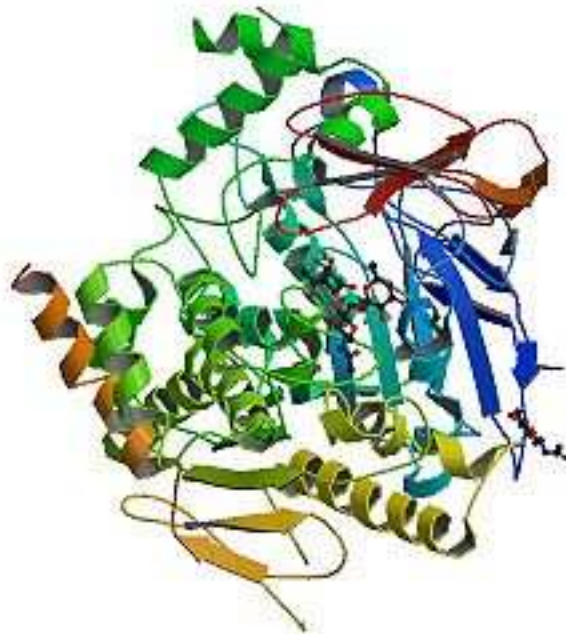
4.1.2.1 Acetylcholinesteráza

AChE je bezesporu nejdůležitější enzym ze skupiny hydroláz a podskupiny esteráz. Je lokalizována v neuronech, zejména na synapsích, v erytrocytech, srdci a nervosvalové

ploténce. V synaptické štěrbině se nachází v těsné blízkosti receptoru, avšak není s ním totožná. (4,5)

Molekula AChE je tvořena dvěma polypeptidickými řetězci – α a β . Na α -řetězci se nachází nejdůležitější místo aktivního povrchu AChE – tzv. katalytické centrum, které je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu (esteratické místo) a karboxylovou skupinou kyseliny glutamové (tzv. α -anionické místo). V tomto katalytickém centru dochází k rozkladu ACh. Na řetězci β se nachází vazebná místa, tedy β -anionické a γ -anionické místo s hydrofobní oblastí. Molekulová hmotnost AChE se pohybuje, dle její molekulární formy, v rozmezí 120 000 až 460 000 daltonů. (4) Molekula AChE je zobrazena na obr. 1

Hlavní biologická úloha AChE spočívá v odbourávání ACh na cholin a kyselinu octovou. Hydrolyza ACh katalytickým působením AChE probíhá v několika stupních. Nejprve je ACh vázán kvarterním dusíkem na α – anionické místo enzymu a karboxylovou skupinou na esteratické místo molekuly AChE, přičemž vzniká komplex enzym – substrát. Odštěpením cholinu vzniká acetylovaný enzym, který reaguje s vodou na komplex kyselina octová – enzym a tento se spontánně hydrolyzuje na kyselinu a AChE. Enzym je pak opětovně připraven na případné štěpení další molekuly ACh. Mimo ACh má AChE afinitu i k butyrylcholinu (BuCh), štěpí ho však velmi malou rychlostí. (4)



Obr. 1 Molekula AChE

4.1.2.2 Butyrylcholinesteráza

BuChE je druhou hydrolázou spadající do podskupiny esteráz. Je známá také jako pseudocholinesteráza nebo nespecifická cholinesteráza. V lidském těle je syntetizována v mnoha tkáních, zahrnujících játra, ledviny, srdce a mozek; dále se vyskytuje se v pankreatu a koluje v plazmě. Stejně jako AChE se i BuChE nachází v neuronech a neurogliích - nové studie dokonce ukazují, že některé neuronální populace vykazují výhradně BuChE aktivitu. Aktivita BuChE stoupá s věkem (> 60 let) či u jedinců trpících Alzheimerovou demencí. BuChE hydrolyzuje oba enzymy, jak (BCh), tak (ACh) i jejich analoga, avšak afinita k ACh je nižší než k BuCh. (4, 25)

Molekula BuChE je tvořená jedním polypeptidickým řetězcem obsahujícím přibližně 25 % sacharidů. Obdobně jako u AChE je katalytické centrum BuChE složeno z esteratického místa a α -anionického místa, na povrchu BuChE se však nevyskytuje β -anionické místo. Molekulová hmotnost BuChE se pohybuje od 60 000 do 750 000 daltonů, dle její molekulární formy (monomer, dimer apod.). (4, 5) Molekula BuChE je znázorněna na obr. 2

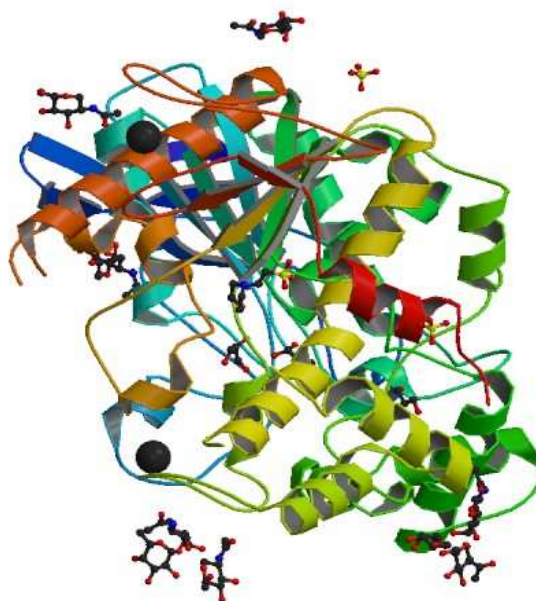
Biologická funkce BuChE byla po dlouhou dobu nejasná a je doposud předmětem vědeckého výzkumu. Doposud zjištěné poznatky, týkající se významu BuChE v lidském organismu, jsou shrnuty v tab. 2

Tab. 2 Role v lidském organismu přisuzované BuChE

1. Morfogeneze, cytogeneze a tumorigeneze
2. Metabolismus lipoproteinů
3. Transformace beta-amyloidu na toxickou formu při AD
4. Scavenger při detoxifikaci určitých chemikálií
5. Hydrolýza ACh v CNS synapsích
6. Regulace buněčné proliferace a počátku diferenciace během časného neuronálního vývoje
7. Přeměna ACh-enzymatické funkce v mozku při AD
8. Tvorba a-beta peptidu
9. Podíl na hydrolýze některých léčiv – kokain, sukcinylcholin

AD: Alzheimerova demence

Absence aktivity BuChE nevede k žádné fyziologické abnormalitě. BuChE má spíše farmakologický či toxikologický význam. Experimentálně se využívá při léčbě kokainové závislosti či jako specifický marker při diagnostice AD. V současné době se testuje jako nový profylaktický prostředek při otravách způsobených inhibitory ChE (ChEI). (25)



Obr. 2 Molekula BuChE

4.2. Inhibitory cholinesteráz

Dle charakteru a místa vazby na aktivním povrchu enzymu lze inhibitory rozdělit na acylující a neacylující. Neacylující inhibitory obsazují vazebné místo enzymů, a tak brání přístupu k ACh. Vazba tohoto typu je reverzibilní a krátkodobá. Stěžejním reprezentantem skupiny reverzibilních ChEI je edrofonium. Vzhledem k jeho krátkému účinku je z terapeutického hlediska nevhodný, nicméně našel uplatnění při diagnostice onemocnění myasthenia gravis.

Nejdůležitějšími zástupci acylujících inhibitorů jsou karbamáty a organofosfáty (OF). Tyto látky reagují s esteratickým místem AChE, které acylují. Dekarbamoylace enzymu, nutná při hydrolýze karbamátu, trvá obvykle několik hodin. Po tuto dobu je funkce enzymu blokována. Mezi inhibitorem typu OF a enzymem se vytváří kovalentní chemická vazba. Odštěpení fosfátového zbytku, defosforylace enzymu, je prakticky nemožná, v důsledku čehož jsou inhibitory tohoto typu prakticky ireverzibilní. (9, 27)

Inhibitory ChE našli své uplatnění jako pesticidy, bojové chemické látky, a tento účinek nalezneme u některých léčiv v humánní medicíně - cholinomimetik, anestetik, sedativ, anxiolytik a antihelmintik, ale zejména se aplikují při léčbě chorob, které souvisí s relativním nedostatkem ACh. Nedostatek tohoto mediátoru je přítomen u některých onemocnění nervového systému - u Alzheimerovy demence či myasthenia gravis.

4.3. Organofosfáty

OF jsou organické sloučeniny fosforu, které našly praktické využití v průmyslu jako změkčovadla, hydraulické kapaliny, sloučeniny pro nehořlavé úpravy různých materiálů, ve veterinární či humánní medicíně jako léčiva či jako sloučeniny k výzkumu nervových funkcí a v neposlední řadě také zejména díky svým vlastnostem (snadná příprava a použitelnost, mimořádně vysoká toxicita a rychle nastupující účinek na živou sílu) ve válečném konfliktu jako bojové chemické látky. Nejširšího použití dosáhly tyto sloučeniny v zemědělství jako pesticidy. Široká oblast jejich použití a dostupnost i silně toxických OF utváří podmínky pro vznik intoxikací různé etiologie. (3, 9)

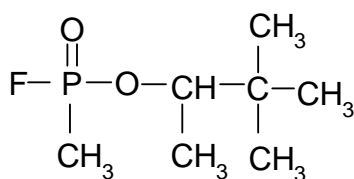
➤ Pesticidy

Jako pesticidy jsou označovány chemické látky používané proti škodlivým činitelům rostlinného i živočišného původu. Používání pesticidů přináší na jedné straně pozitivní efekt v podobě ochrany před škůdci, na straně druhé ale zvyšující se podíl pesticidů vede k průniku těchto látek do biosféry a do potravního řetězce. (7)

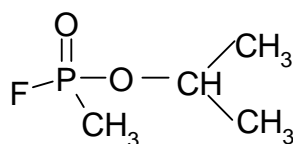
V zemědělství našli OF praktické využití především jako insekticidy, tj. látky působící proti hmyzu (např. Metathion, Malathion, Actellic, In-stop aj.) (11)

V současné době představují OF více jak polovinu insekticidů používaných v USA. OF nahradily dříve používané insekticidy na bázi chlorovaných organických sloučenin (DDT, HCD, aldrin, dieldrin), a to díky svému rychlému rozpadu, díky čemuž nedochází ke kumulaci v životním prostředí a v organismech. Tato výhodná vlastnost však přišla na úkor větší akutní toxicity vůči člověku i zvířatům. Smrtelná dávka pro člověka je podle druhu organofosfátu odhadována v rozmezí od 5mg/kg až 100 mg/kg po p.o. požití. Při perkutánní aplikaci je smrtelná dávka přibližně 2-3x vyšší. V zemích, kde se pesticidy tohoto typu používají, zapříčiňují každoročně velký počet otrav, ať již profesionálních, suicidálních nebo náhodných. Odhaduje se, že ročně dojde na celém světě ke 3 milionům případů otravy OF a každá desátá má pro oběť fatální následky. V některých rozvojových zemích (např. Malajsie)

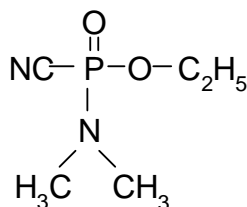
Pesticidy bývají odvozeny od kyseliny fosforečné, kdežto NPL patří nejčastěji mezi deriváty kyseliny fosfonové, méně pak fosforečné. Obecně platí, že toxicita OF pesticidů bývá daleko nižší než toxicita NPL - estery kyseliny fosfonové mají vyšší toxicitu než analogické estery kyseliny fosforečné. Struktura nejznámějších BCHL a pesticidů je uvedena na obr. 4-10



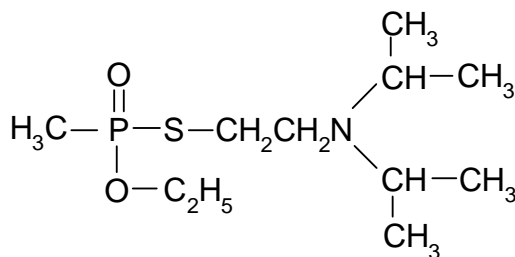
Obr. 4 Soman



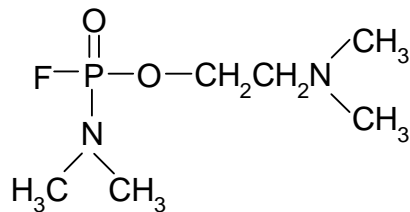
Obr. 5 Sarin



Obr. 6 Tabun

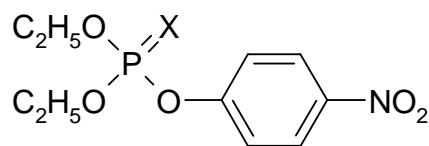


Obr. 7 VX



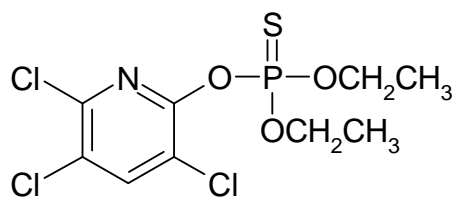
Obr. 8 GV

Na obr. 4-8 Jsou uvedeny chemické struktury nejznámějších NPL [3]



Obr. 9 X = O...paraoxon

X = S...parathion



Obr 10 chlorpyrifos

Na obr. 9-10 jsou uvedeny struktury některých OF pesticidů

4.3.2. Osud v organismu

OF pronikají do organismu všemi branami vstupu – při profesionálním poškození nejčastěji inhalační cestou, perkutánně či přes spojivky u přímého zasažení očí, při náhodných či suicidálních otravách pak zejména perorálně. V místě vstupu obvykle nedráždí a bezprostředně většinou nevyvolávají ani nepříjemné subjektivní pocity. (3)

Po vstupu do organismu prochází OF čtyřmi hlavními fázemi účinku: resorpcí, transportem, metabolizací a vlastním toxickým efektem. Vlastní toxický efekt je realizován

pouze zlomkem podané dávky OF, zbytek dávky představují ztráty, vznikající nejrůznějším způsobem. Ztráty mohou podle druhu OF dosáhnout 50 až 99 %. V krevním řečišti reagují OF s cholinesterázami a dalšími hydrolázami (mj. i BuChE) a s dalšími bílkoviny plazmy. Faktu, že vazba OF na esterázy nevyvolává na rozdíl od inhibice AChE žádné klinické příznaky intoxikace využívají některé nové přístupy k prevenci a léčbě akutních intoxikací těmito noxami. Tyto esterázy působí v řečišti jako scavengery (vychytávači) a brání tak dalšímu postupu OF do organismu a vyřazují ho z vlastního toxického účinku. OF jsou dále z krevního řečiště transportním systémem zaneseny na místo metabolizace a toxického efektu. Metabolizace zahrnuje detoxifikační reakce zejména v játrech, exkreci a interakci s enzymy – takto navázaný OF je opět vyřazen z dalšího účinku. Metabolizace však zahrnuje i oxidační reakce (zejména u OF insekticidů), vedoucí ke vzniku toxičtější sloučeniny, která je vyplavena zpět do oběhu a způsobit tak další vlnu intoxikace. Některé NPL (zejména soman) mohou vytvářet depa v tukové tkáni, z nichž je látka opět postupně vyplavována do organismu. V místě toxického efektu (CNS, PNS a některé efekторы) OF inhibuje AChE. (3, 11)

4.3.3 Mechanismus toxického účinku, dealkylace

OF blokují životně důležité esterázy, přičemž samotný toxický účinek vyplývá z inhibice AChE na synapsích CNS a PNS. Inhibovaná AChE již nemůže štěpit ACh a na těchto cholinergních synapsích dochází k hromadění ACh a tedy v podstatě k endogenní intoxikaci ACh, která nastane v důsledku jeho zvýšené koncentrace na cholinergních receptorech. (11, 3)

AChE je inhibována mechanismem kovalentní vazby OF na esteratické místo enzymu, díky čemuž je toto místo blokováno pro vazbu s ACh. Takto vzniklý komplex OF-AChE (fosforylovaný enzym) se vodou hydrolyzuje velmi pomalu, a proto je AChE pro normální funkci zablokována. [4]. Znovuobnovení aktivity AChE probíhá spontánně velmi malou rychlostí. Reaktivaci je možno urychlit přidáním některých reaktivátorů cholinesteráz (např. oximů). U některých OF (soman) však probíhá po navázání látky do aktivního místa enzymu děj zvaný dealkylace, což je chemická reakce, při které je jedna z alkoxylových skupin navázaných na fosfor odštěpena účinkem vody ve formě alkoholu. Proces dealkylace nemá vliv na toxické vlastnosti OF, protože jak inhibovaný, tak dealkylovaný enzym má sníženou, resp. nulovou aktivitu a tedy nemůže vykovávat svoji fyziologickou funkci. Velký význam této reakce však spočívá ve změně vlastností inhibovaného enzymu v tom smyslu, že dealkylovaná AChE není přístupná účinku reaktivátorů ChE, tzn., že není možné za pomoci

chemických látek znovu obnovit její aktivitu – reaktivovat ji. Rychlost dealkylace je závislá na době kontaktu enzymu s OF a na chemické struktuře OF. (3, 4, 15)

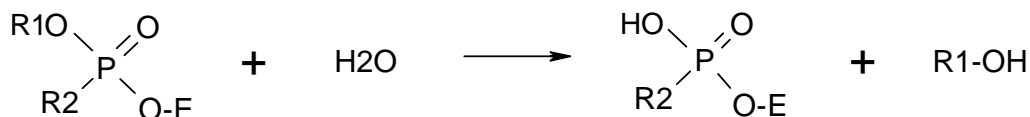


Schéma 1 Dealkylace fosforylovaného enzymu

4.3.4. Klinický obraz akutní intoxikace

Symptomy intoxikace OF vycházejí z účinku nahromaděného ACh na synapsích – tedy ze zvýšeného tonu parasympatiku. Podle receptorů, na kterých dochází ke kumulaci ACh, se intoxikace projevuje muskarinovými, nikotinovými a centrálními příznaky. Přehled příznaků intoxikace je zobrazen v tab. 3

Tab. 3 Přehled příznaků intoxikace OF (3, 8)

muskarinové	<p><i>zornice</i> <i>ciliární sval</i> <i>spojivky a nosní sliznice</i> <i>slinné, slzné a potní žlázy</i></p> <p><i>dýchací cesty</i></p> <p><i>hladká svalovina GIT a močového systému</i> <i>srdce</i></p>	<p>mióza poruchy akomodace překrvení</p> <p>↑ slinění, slzení, pocení</p> <p>↑ sekrece v HDC i bronších, bronchokonstrikce</p> <p>↑ peristaltika, tenesmy, poruchy mikce a defekace</p> <p>bradykardie, ↓TK</p>
nikotinové	<p><i>kosterní svalstvo</i></p> <p><i>respirační systém</i></p>	<p>svalová slabost, paralýza</p> <p>omezení ventilace, křeče, paralýza dýchacích svalů, bronchokonstrikce, ↑ bronchiální sekrece</p>
centrální		<p>bolesti hlavy, úzkost, emoční labilita, napětí, neklid, dekoncentrovanost, závratě, depresivní stavy, zmatenost, ataxie, bezvědomí</p>

Nástup příznaků intoxikace a jejich intenzita závisí na dávce a cestě vstupu organofosfátů do organismu. Nejčastějším způsobem otravy u OF bývá perorální intoxikace, která může vzniknout náhodně či při suicidálním úmyslu. Podle dávky a v závislosti na toxicitě požitého OF se příznaky projeví za cca 15 min. – 2 hod. Jedná se především o gastrointestinální příznaky, charakterizované jako bolesti břicha kolikovitého charakteru a nevolnosti, která může přejít ve zvracení. Dále se projeví svalová slabost, bolesti ve svalech, ztížené dýchání a zhoršené vidění. Mohou se objevit pocity úzkosti, bolesti hlavy, nesoustředěnost, hyperexcitace nebo útlum. Objektivně je pozorována mióza, která zejména v časných stádiích nebývá výrazná, objevuje se bradykardie, zvracení, zvýšený svalový tonus a živější reflexy. Později dochází ke svalovým fibrilacím, které přecházejí v tonicko-klonické křeče a bezvědomí, pokles krevního tlaku a kóma.

U inhalační formy intoxikace jsou v porovnání s intoxikací p.o. zvýrazněny příznaky ztíženého dýchání, více vyjádřena mióza a trávicí obtíže nejsou tak výrazné. Výrazné jsou příznaky centrální. Také průběh otravy je rychlejší, příznaky se projevují již po několika minutách.

U perkutánního zasažení nastávají příznaky za 2-3 hod. Mióza bývá většinou dosti nevýrazná, přidávají se gastrointestinální obtíže, méně dechové obtíže a centrální příznaky.

Akutní intoxikace probíhá formou lehké, středně těžké či těžké otravy. Zatímco lehká otrava vzniká po latenci 10 min. až 2 hodin a je charakterizována zejména centrálními a muskarinovými příznaky, středně těžká otrava nastává po kratší době latence – do 1 hodiny latence a uplatňují se zde i nikotinové příznaky. Těžká otrava je typická postupným vystupňováním všech tří typů příznaků. Otrava vzniká v závislosti na bráně vstupu a dávce OF velmi krátce po expozici – minuty až 1 hod. Smrt nastává následkem bronchospasmu nebo paralýzy příčně pruhovaného svalstva, popř. u látek s výraznými centrálními účinky následkem centrálního útlumu dechu. Vědomí bývá obvykle dlouho zachované. (3,8)

Kontakt s určitými OF látkami (např. tri-o-kresylfosfát) může vyústit v tzv. neurotoxický efekt. Neurotoxický účinek není podmíněn inhibicí AChE, ale vzniká fosforylací jiného enzymu, tzv. neurotoxické esterázy, která je přítomna v nervové tkáni. Jedná se o stav, který se manifestuje přibližně za 8 dní až 1 měsíc po expozici OF a je charakterizovaný motorickými a sensorickými poruchami a histologickými změnami v periferních neuronech (degenerace axonů a následná degenerace myelinu). Klinický průběh zahrnuje fázi cholinergního dráždění projevující se sekrecí z HCD, slzením, faryngitidou, laryngitidou; může se vyskytnout i dysfagie. Dále se vyskytují bolesti až parestezie končetin. Typickým příznakem u všech postižených jsou bolesti až křeče v lýtkách. Během několika

hodin pak následuje obrna volních pohybů, která se v průběhu dalších dní zhoršuje. Obrna začíná distálně a šíří se proximálně, horní končetiny jsou postiženy během 1-2 týdnů; senzitivní inervace bývá zasažena minimálně. Stadium paralýzy trvá 1-2 měsíce. Po ní následuje stadium denervace, zejména malých svalů horních i dolních končetin a dále těžká atrofie svalů rukou i nohou. Časové rozmezí pro tuto fázi se udává mezi 2-6 měsíci. Období rekonvalescence může být velmi dlouhé; sklony ke spasticitě a abnormálním šlachovým reflexům mohou přetrvávat i po desítkách let. Specifická terapie zabráňující vzniku neurotoxického účinku a jeho progresi v současné době není známa. (3, 5, 8)

4.3.5. Chronické otravy

Chronické otravy vznikají při opakované expozici nízkými koncentracemi OF. Po opakovaném působení malých dávek OF dochází k postupné inhibici AChE na cholinergních nervových synapsích a k senzibilizaci receptorů na zvýšenou hladinu ACh. Smrt pak může nastat i po malém množství OF. Toto období může být zcela bezpříznakové, někdy se vyskytují nespecifické obtíže především centrálního charakteru (zvýšená hyperreaktivita, emoční labilita, poruchy spánku, zvýšená únavnost). (3)

4.3.6. Diagnostika, terapie

Pro rychlé a správné stanovení diagnózy je důležitá především anamnéza, zejména průkaz kontaktu s OF, dále vyšetření klinického stavu otráveného a laboratorní vyšetření.

Z krevních vyšetření je nejvýznamnější stanovení aktivity krevních cholinesteráz. Aktivita plazmatické cholinesterázy slouží k detekci akutní otravy, zatímco aktivita acetylcholinesterázy přítomné v erytrocytech je vhodná pro hodnocení dlouhotrvající, chronické expozice OF. OF inhibují jak plazmatickou CHE, tak AChE na synapsích a proto stanovená aktivita CHE v plazmě koreluje s inhibicí enzymu nezbytného při přenosu nervového vzruchu. [12] Základní hodnoty aktivity AChE jsou interindividuálně variabilní, proto je důležitá dynamika těchto hodnot. Vzestup aktivity AChE o 15 – 20% během prvních 3 – 5 dnů je průkazem otravy. BuChE v plazmě u akutních otrav nekoreluje s tíží otravy, u těžkých otrav může být i normální a její stanovení se hodí spíše jako biologický expoziční test u pracujících s organofosfáty. (13)

U některých OF (např. parathion), kde je metabolitem p-nitrofenol, je možno nalézt jeho zvýšenou hladinu v moči. Tento ukazatel však poukazuje pouze na proběhlou expozici, jeho hladina nekoreluje s tíží otravy. Definitivní potvrzení diagnózy je možné pomocí specializovaných vyšetření (test reaktivovatelnosti, volný OF či jeho metabolity v krvi). (3, 13)

Vzhledem k vysoké toxicitě OF, rychlému nástupu účinku a ohrožení základních životních funkcí musí být terapie dostatečně rychlá, radikální a komplexní. V rámci první pomoci je třeba zabránit dalšímu průniku inhibitoru do organismu – opuštění zamořeného prostoru, při bezvědomí vnesení zasaženého, odstranění potřísněného oděvu, opláchnutí či omytí kůže, výplach spojivek (voda, 2% roztok bikarbonátu). (3) Při nutnosti KPR by měl záchránce dbát osobní bezpečnosti, zejména pak při technice umělého dýchání individuálně zvážit použití ochranných pomůcek (ústní rouška). V případech perorálních otrav se vyvolává zvracení; podávání mléka, alkoholu a tuků je kontraindikováno. Laváž žaludku je možno provést do 4 – 6 hodin po expozici; vysoké dávky aktivního uhlí se podávají i několik dní. Každou osobu otrávenou OF je nutno hospitalizovat, pokud možno na odd. ARO nebo JIP na dobu nejméně 24 hodin se zajištěním jejího monitorování. (3, 8, 13)

Základ léčby otrav OF spočívá v aplikaci antidotní terapie: anticholinergik (symptomatická terapie) a reaktivátorů ChE (kauzální terapie). (11)

Z anticholinergik je lékem první volby na celém světě atropin, který zabraňuje navázání akumulovaného ACh na cholinergní receptory a tak brání jejich nadměrné stimulaci. Atropin antagonizuje účinek nahromaděného ACh především na periferních muskarinových receptorech. Vzhledem k obtížnému prostupu přes hematoencefalickou bariéru méně ovlivňuje příznaky centrální; příznaky nikotinové (svalová slabost či paralýza) nejsou ovlivněny takřka vůbec. Dávka a způsob podání se odvozuje od závažnosti stavu, přičemž hlavním indikátorem následné velikosti a frekvence podávání dalších dávek je atropinizace pacienta (suchost sliznic, ústup bronchiální sekrece a pocení, zčervenání kůže, zrychlení tepové frekvence, zlepšení klinického stavu). U středních a těžkých otrav je možné léčbu atropinem doplnit o perorální podání Benactyzinu, který mírní centrální účinky otravy a příznivě ovlivňuje i její křečovou složku. (3, 13) Na základě experimentálních výsledků se jako další vhodná anticholinergika s převahou centrálního účinku jeví biperiden nebo skopolamin, je však možno použít i další anticholinergika. (11) Způsob aplikace a velikost dávky pro jednotlivé medikamenty jsou uvedeny v tab. 4

Tab. 4 Dávkování a způsob aplikace jednotlivých anticholinergik

funkční antidotum		dávka v mg		
		<i>p.o</i>	<i>i.m.</i>	<i>i.v.</i>
<i>Atropin</i>	dospělí		2 - 5	2 - 5
	děti (dle věku)		0,5 - 2	0,5 - 2
<i>Benactyzin</i>				
<i>Skopolamin</i>			0,5 - 1,0	0,5 - 1,0
<i>Trasentin</i>			50 - 100	50 - 100
<i>Tiphen</i>		20 - 30		
<i>Tropacin</i>		10 - 12,5		

K tomu, aby vymizely nebezpečné příznaky otravy je potřeba obnovit alespoň zlomek normální enzymové aktivity. Spontánní aktivita CHE se však obnoví až po neosyntéze molekul enzymu, což trvá relativně dlouhou dobu – regenerace cholinesterázy v mozku trvá přibližně 50 dní; aktivita erytrocytární CHE se obnoví až za 100 dní. (14) Reaktivátory AChE umožňují návrat k normálnímu přenosu cholinergního nervového vzruchu cestou reaktivace inhibované AChE. Oximová skupina těchto reaktivátorů reaguje s fosfátem inaktivovaného enzymu a dochází tak k hydrolýze fosforylovaného enzymu. (8, 11) Reaktivátory působí hlavně na nikotinové a částečně i CNS příznaky, mohou zabránit vzniku opožděné neurotoxicity. Reaktivátory se aplikují u těžších otrav, u málo toxických OF jsou neúčinné nebo průběh otravy naopak zhoršují. Vzhledem k sílící vazbě fosforu na enzym vlivem probíhající dealkylace by léčba měla být zahájena co nejdříve (nejúčinnější je v prvních 6 hod., resp. v prvních 24 hod.). Pokud se po první dávce stav postiženého nezlepší, popř. nedojde-li ke zvýšení hodnot aktivit ChE, oximy by neměly být dále podávány (zejména není-li diagnóza jasná). (8, 13) Při zlepšení klinického stavu je možno opakovat podání reaktivátoru v iniciální dávce každé 2 – 4 hod. (3) Nejběžnějšími ve světě dosud používanými reaktivátory jsou monopyridiniové (pralidoxim) či bispyridiniové oximy (obidoxim, methoxim, trimedoxim či oxim HI-6). Žádný z dosud známých reaktivátorů AChE však nedokáže efektivně reaktivovat AChE inhibovanou všemi známými organofosfáty. (16) Způsob aplikace a velikost dávky pro jednotlivé oximy jsou uvedeny v tab. 5

Tab. 5 Dávkování a způsob aplikace jednotlivých oximů

látka	dávkování v mg	
	<i>i.m.</i>	<i>i.v.</i>
<i>Pralidoxim jodid</i>	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0
<i>Pralidoxim chlorid</i>	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0
<i>Obidoxim</i>	0,25	0,25
<i>Trimedoxim</i>	0,20 - 0,25	0,20 - 0,25
<i>Methoxim</i>	1	1
<i>HI-6</i>	0,8 - 1,0	0,8 - 1,0

Jako podpůrnou terapii otravy OF lze použít serum cholinesterasum humanum, které suplementuje chybějící cholinesterázu. Dávkování je velmi rozdílné, závislé na množství v krvi kolujících OF. Mělo by být tak vysoké, aby došlo k vzestupu aktivity ChE v seru pokud možno na dolní hranici normálních hodnot. V léčbě je doporučováno pokračovat do trvalé úpravy aktivity ChE k normálu. (17)

Kromě specifické terapie je nutno zajistit monitorování postiženého, dle jeho stavu řídit ventilaci, při výskytu centrálně vyvolaných křečí použít tlumící látky (např. diazepam), symptomaticky léčit silnou bronchiální sekreci, eventuálně korigovat acidobazickou rovnováhu. (14)

4.3.7. Prevence intoxikace; farmakologická profylaxe

Při práci s jedy je nutné dodržovat zásady bezpečnosti práce, a to jak z hlediska ochrany životního prostředí, tak z hlediska pracovníka. Jde o dodržování pokynů výrobce, technologických postupů a pokynů pro likvidaci jedu po skončení jeho použití. Základní sestavu ochranných pomůcek většinou tvoří ochranný oděv pro postřík, brýle, štít nebo respirátor, gumové rukavice a holínky. Ochranné pomůcky musí být v pořádku a musí se denně kontrolovat, protože poškozené nebo nedokonale odmořené pomůcky mohou být příčinou otrav. (3)

Každý příslušník AČR je pro případ expozice OF vybaven tzv. individuálním protichemickým balíč

ERROR: syntaxerror
OFFENDING COMMAND: --nostringval--

STACK: