



## **Středoškolská technika 2018**

**Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT**

# **SROVNÁNÍ ÚČINNOSTI KVARTERNÍHO A NEKVARTERNÍHO REAKTIVÁTORU**

**Markéta Šimková**

První soukromé jazykové gymnázium  
Brandlova 875, Hradec Králové 3, 500 03

# **První soukromé jazykové gymnázium Hradec Králové**

## **Srovnání účinnosti kvarterního a nekvarterního reaktivátoru**

**Autor práce:**

**Markéta Šimková**

**Vedoucí práce:**

**RNDr. Michal Hruška**

**Odborný konzultant:**

**kpt. PharmDr. Vendula Hepnarová, Ph.D.**

**Katedra toxikologie a vojenské farmacie**

**Fakulta vojenského zdravotnictví**

**Univerzita obrany**

**Hradec Králové**

**3. ledna 2018**

**PSJG-HK**

**2017**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých- jsem vycházela.

.....

V Hradci Králové dne 3. ledna 2018

Markéta Šimková

## **Poděkování**

Děkuji všem, kteří přispěli radou nebo pomocí k úspěšnému dokončení této práce. Jmenovitě bych velmi ráda poděkovala svým rodičům – Ing. Lucii Šimkové a Ing. Romanu Šimkovi za každodenní podporu a pomoc. Dále děkuji vedoucímu práce RNDr. Michalu Hruškovi, odborné konzultantce kpt. PharmDr. Vendule Hepnarové, Ph.D.za všechny rady, připomínky a odbornou pomoc. V neposlední řadě také děkuji kolektivu zaměstnanců Katedry toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové za příjemné pracovní prostředí.

V Hradci Králové dne 3. ledna 2018

Markéta Šimková

## **Anotace**

ŠIMKOVÁ, Markéta. *Srovnání účinnosti kvarterního a nekvarterního reaktivátoru*. Hradec Králové, 2018. Vedoucí práce RNDr. Michal Hruška. 61 s.

V dnešní době jsou inhibitory acetylcholinesterasy (AChE) známy hlavně jako nervově paralytické látky (NPL), které byly použity např. v Sýrii. Na řadě míst po celém světě jsou tyto látky stále skladovány, syntetizovány a dále vyvíjeny. Nejen z těchto důvodů jsou nervově paralytickými látkami i v současné době ohroženy miliony lidí po celém světě. Jako protiváha proti této hrozbě se také v České republice testují a vyvíjejí nové reaktivátory, látky obnovující (reaktivující) aktivitu enzymů a používající se jako funkční antidota po zasažení organismu NPL.

V teoretické části jsou sumarizovány doposud známé informace o acetylcholinu (ACh), acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), inhibitorech AChE a reaktivátorech. Praktická část práce je věnována měření aktivity AChE v myší krvi, mozcích a bránicích. Myši byly pro účely prováděných experimentů rozděleny do čtyř skupin podle aplikovaných látek. První skupina byla kontrolní s pouhým přidáním fyziologického roztoku s atropinem. V dalších třech skupinách byl organismus myši zainhibován sarinem, což je NPL, a následně byly dvě z těchto skupin léčeny reaktivátory (pralidoximem a K1280). V dnešní době totiž neexistuje žádná látka, která by dokázala obnovit aktivitu na 100 %, proto se stále zkoumají a testují nové látky.

Hlavním cílem této práce je srovnání účinnosti kvarterního (pralidoxim) a nekvarterního (K1280) reaktivátoru po inhibici sarinem.

Bylo zjištěno, že nově připravená testovaná látka K1280 prokázala srovnatelné výsledky se standardním reaktivátorem - pralidoximem.

**Klíčová slova:** AChE, reaktivátor, K1280, pralidoxim, nervově paralytická látka, sarin

## Annotation

ŠIMKOVÁ, Markéta. *The Comparison of Quaternary and Non-quaternary Reactivators Effectiveness*. Hradec Králové, 2018. Supervised by RNDr. Michal Hruška. 61 p.

Nowadays, the inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) are known mainly as the nerve paralytic agents, which were used in Syria, for instance. The substances are stored, synthesized and continuously developed worldwide. Not only because of these reasons, millions of people are still endangered with nerve paralytic agents all over the world. As the opposing force, new reactivators, substances that regenerate (reactivate) enzyme activity, that are used as a functional antidota after affecting the organism, have been tested and developed also in the Czech Republic.

The theoretical part summarizes loads of hitherto known information dealing with acetylcholine (ACh), acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), AChE inhibitors and reactivators.

The practical part is devoted to the measuring of the AChE activity in the mouse blood, brains and diaphragms. The mice were divided into four groups according to the applied substance. The first group served as the verified one, the mice were applied the physiological saline with atropine. In the other three groups, the organisms of the mice were infected with Sarin which is the nerve paralytic agent used as a chemical weapon and afterwards two of these groups were treated with reactivators (pralidoxime and K1280). Currently, there is no substance that can restore activity to 100%, therefore new substances are still being investigated and tested.

The main goal of the thesis is the comparison of quaternary (pralidoxime) and non-quaternary (K1280) reactivators effectiveness when Sarin is applied.

It was found that the newly prepared test substance K1280 showed comparable results with the standard reactivator - pralidoxime.

**Key words:** AChE, reactivator, K1280, pralidoxime, nerve paralytic substance, Sarin

## **Seznam použitých zkratk**

AcCoA – Acetylkoenzym A

ACh – Acetylcholin

AChE – Acetylcholinesterasa

AChEI – Inhibitor acetylcholinesterasy

ATP – Adenosintrifosfát

BChE - Butyrylcholinesterasa

CAS – Katalický aktivní místo (Catalic active site)

CNS – Centrální nervový systém

DTNB - kyselina 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová, (Ellmanovo činidlo)

ChE – Cholinesterasa

mAChR – Musikarinové cholinergní receptory

nAChR – Nikotinové cholinergní receptory

NPL – Nervově paralytické látky

PAS – Periferní aniontové místo (Peripheral anionic site)

## Obsah

Úvod a cíl práce.....	9
TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 Acetylcholin .....	10
1.1 Receptory pro ACh.....	11
2 Cholinesterasa (ChE).....	12
2.1 Acetylcholinesterasa .....	12
2.2 Butyrylcholinesterasa .....	12
3 Inhibitory AChE.....	14
3.1 Kompetitivní inhibitory .....	14
3.1.1 Alzheimerova choroba .....	14
3.2 Nekompetitivní inhibitory .....	17
3.2.1 Karbamáty .....	17
3.2.2 Organofosfáty.....	17
3.3 Akompetitivní inhibitory .....	19
4 Reaktivátory .....	20
4.1 Kvarterní reaktivátory.....	20
4.2 Léčba .....	22
4.3 Nekvarterní reaktivátory.....	22
PRAKTICKÁ ČÁST .....	25
5 Materiál a metodika.....	25
5.1 Zvířata.....	25
5.2 Pomůcky .....	25
5.3 Příprava použitých roztoků.....	25
5.3.1 Tris pufr 0,1 M .....	25
5.3.2 Tris pufr 0,02 M .....	25
5.3.3 HCl .....	26
5.3.4 Acetylthiocholin .....	26
5.3.5 DTNB .....	26
5.3.6 Směs (DTNB + 0,1 M pufr) .....	26
5.4 Postup měření aktivity AChE.....	27
5.4.1 Stanovení aktivity cholinesteras v krvi .....	28
5.4.2 Stanovení aktivity cholinesteras v mozku .....	30
5.4.3 Stanovení aktivity cholinesteras v bránici.....	32
5.4.4 Kalibrace spektrofotometru.....	33
5.5 Výsledky.....	34
5.5.1 Aktivita AChE v krvích pozorovaných myší .....	35
5.5.2 Aktivita AChE v mozcích pozorovaných myší.....	36
5.5.3 Aktivita AChE v bránicích pozorovaných myší.....	37
5.6 Vyhodnocení výsledků .....	38
Diskuse .....	39
Závěr.....	41
Seznam použitých pramenů literatury.....	42
Seznam zdrojů obrázků .....	45
Seznam použitých obrázků.....	47
Seznam zdrojů tabulek .....	48
Seznam použitých tabulek.....	49
Seznam zdrojů grafů.....	50
Seznam použitých grafů .....	51
Přílohy .....	52



## Úvod a cíl práce

V současnosti byly inhibitory AChE (AChEI) zneužity při válečných konfliktech (Sýrie) či teroristických akcích (Malajsie). Stále není k dispozici reaktivátor, který by účinně, efektivně a dostatečně rychle reaktivoval choliesterasy zasažené různými druhy NPL. Z tohoto důvodu je nutné vyvíjet nové reaktivátory, které by bylo možné aplikovat jako funkční antidota po zasažení organismu NPL.

Jednou z možností jsou kvarterní reaktivátory (např. pralidoxim, obidoxim, methoxim a trimedoxim), které jsou běžně připravovány několika stupňovými chemickými reakcemi. Obsahují však dva kvarterní dusíky (jeden nebo dva kladně nabitě atomy) a vzhledem k charakteru jejich molekuly je zapotřebí tyto sloučeniny zahřívat často po velmi dlouhou dobu. Je tudíž nutný nejen dlouhý reakční čas a elektrická energie na zahřívání, ale také např. voda na chlazení refluxu rozpouštědla (Musílek, 2017).

Oproti tomu se testují tzv. nekvarterní reaktivátory, které mají zlepšený přístup přes hematoencefalickou bariéru. U kvarterních se díky přítomnosti kvarterního dusíku děje to, že přes tuto bariéru prochází reaktivátory AChE typu pyridiniových aldoximů (obidoxim, HI-6) ve sníženém množství, které z tohoto důvodu nejsou schopné v CNS plně reaktivovat AChE (čímž způsobují v CNS chronické neuronální poruchy) Proto je jednou ze slibných nadějí právě vývoj nových centrálně aktivních nekvarterních reaktivátorů, které by mohly účinněji procházet hematoencefalickou bariéru (Musílek, 2017).

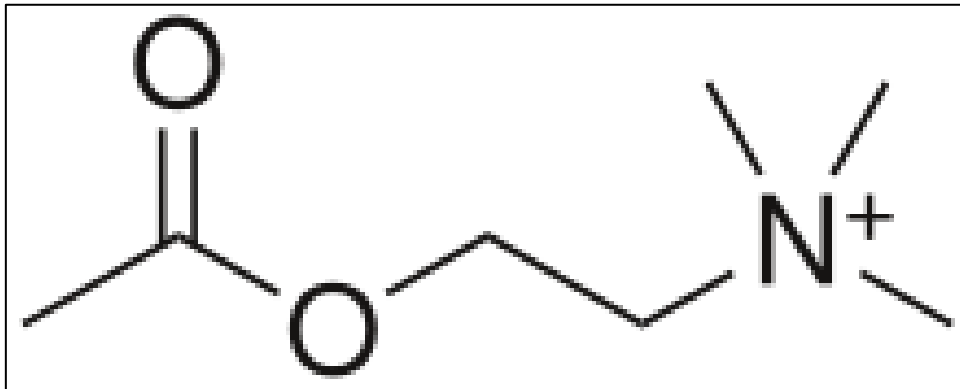
Cílem práce je tak porovnat účinnost kvarterního a nekvarterního reaktivátoru při inhibici NPL a také poskytnout přehled informací o inhibitech AChE a jejich reaktivátorech v českém jazyce. Věřím tak, že moje práce přispěje k testování a výzkumu nových látek (reaktivátorů) proti chemickým zbraním, používaných v dnešní době.

Výzkum probíhal na podzim roku 2017 na Katedře toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany (FVZ UO) v Hradci Králové. Během této doby jsem měřila aktivitu AChE v myších orgánech pomocí spektrofotometrické metody, zaznamenávala data do jednotlivých tabulek a pořizovala fotografie. Při experimentech jsem byla pod dohledem mé odborné konzultantky kpt. PharmDr. Venduly Hepnarové, Ph.D., která mě předem proškolila o bezpečnosti práce. Aplikaci sarinu prováděli pracovníci KTVF FVZ UO. Experimenty probíhaly se souhlasem rodičů.

# TEORETICKÁ ČÁST

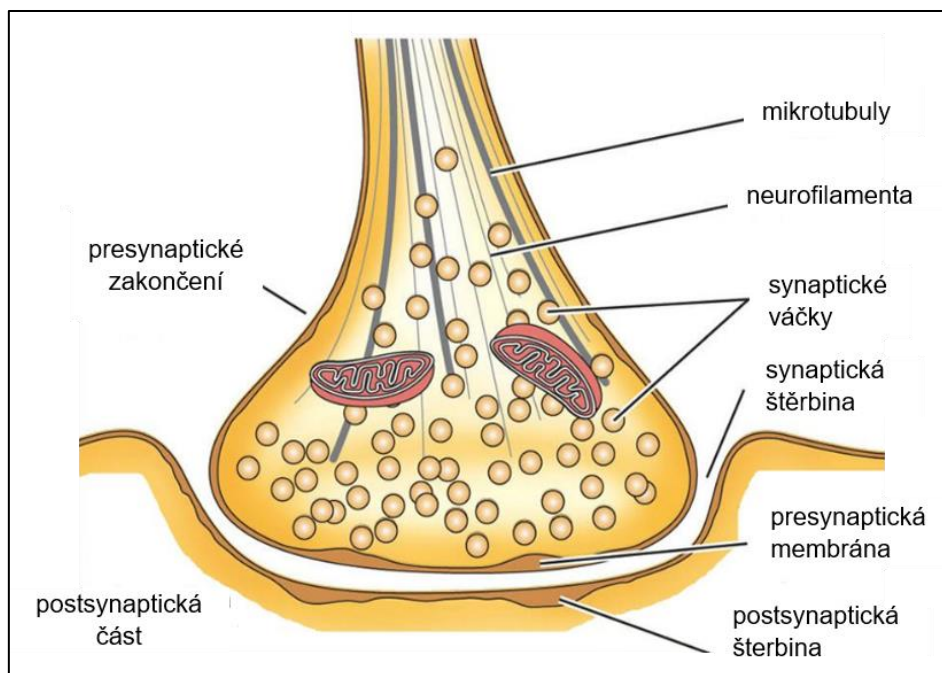
## 1 Acetylcholin

Acetylcholin (ACh) se skládá z cholinu a acetátu (Obrázek 1). Je tvořen jedнокrokovou syntézou, což je přenos acetylu z acetylkoenzymu A (AcCoA) na cholin pomocí cholinacetyltransferasy. Enzym acetylcholinesterasa (AChE) se nachází v synaptické štěrbině a štěpí acetylcholin na cholin a acetát, při transportu do presynaptického zakončení, což vede k ukončení přenosu signálu mezi buňkami (transmise). Intracelulární účinky (účinky uvnitř buňky) ACh jsou zprostředkovány aktivací nikotinových a muskarinových receptorů. ACh je jedním z běžných neurotransmiterů nacházejících se v centrální a periferní nervové soustavě (Picciotto, Alreja, Jentsch, 2002).



Obrázek 1 Acetylcholin, (Acetylcholine, 2001)

ACh je syntetizován z cholinu, který je acetylován za pomoci AcCoA a umožňuje přenos nervového vzruchu z periferního nervstva na sval. Nejdříve nervová informace je shromažďována ve vezikulech, poté stěna vezikuly splyne s cytoplazmatickou membránou. ACh se vylíje do synaptické štěrbině a následně se naváže na acetylcholinový receptor. Tím dojde ke změně prostorového uspořádání receptoru a membrána začne propouštět ionty  $Na^+$ , které směřují do buňky, čímž dochází ke změně elektrického potenciálu na postsynaptické membráně a vzniklý elektrický impulz (potenciál) se začne šířit nervosvalové motorické ploténky podél cytoplazmatické membrány svalového vlákna (Obrázek 2). Katalytickým působením enzymu AChE dochází poté k okamžitému rozkladu neuromediátoru, aby bylo zaručené, že působí jen nezbytně dlouhou dobu (Paar, 2006).



Obrázek 2 Synapse, (Marek, 2017)

Po dokončení rozkladu ACh se acetylcholinový receptor vrátí opět do původního stavu (Paar, 2016).

## 1.1 Receptory pro ACh

V dnešní době jsou známy dva druhy acetylcholinových receptorů – muskarinové (mAChR) a nikotinové (nAChR) (Brandlová, 2012).

První typ je pojmenován podle muskarinu, což je alkaloid vyskytující se v plodnicích hub rodu vláknice, rodu strmělka a v menším množství také v mochohůrce červené. Muskarinové receptory jsou spojeny s G proteinem, který má vliv na aktivaci celého děje. Rozdělují se do pěti podtypů – M1, M2, M3, M4 a M5 receptory. M1 receptory se nachází na nervových zakončeních, M2 v hladkých svalech, srdci a nervech, M3 ve žlázách a hladkých svalech a u M4 a M5 není umístění receptorů dostatečně prostudováno. Známým a v lékařství využívaným antagonistou mAChR je atropin, což je druh alkaloidu s halucinogenními účinky. U intoxikovaného člověka nejdříve atropin způsobuje vzrušení a krátké psychické změny, následně zrychluje srdeční činnost, zvyšuje nitrooční tlak, snižuje slinění (nastává sucho v ústech) a dochází také například ke zvýšení tělesné teploty (Brandlová, 2012).

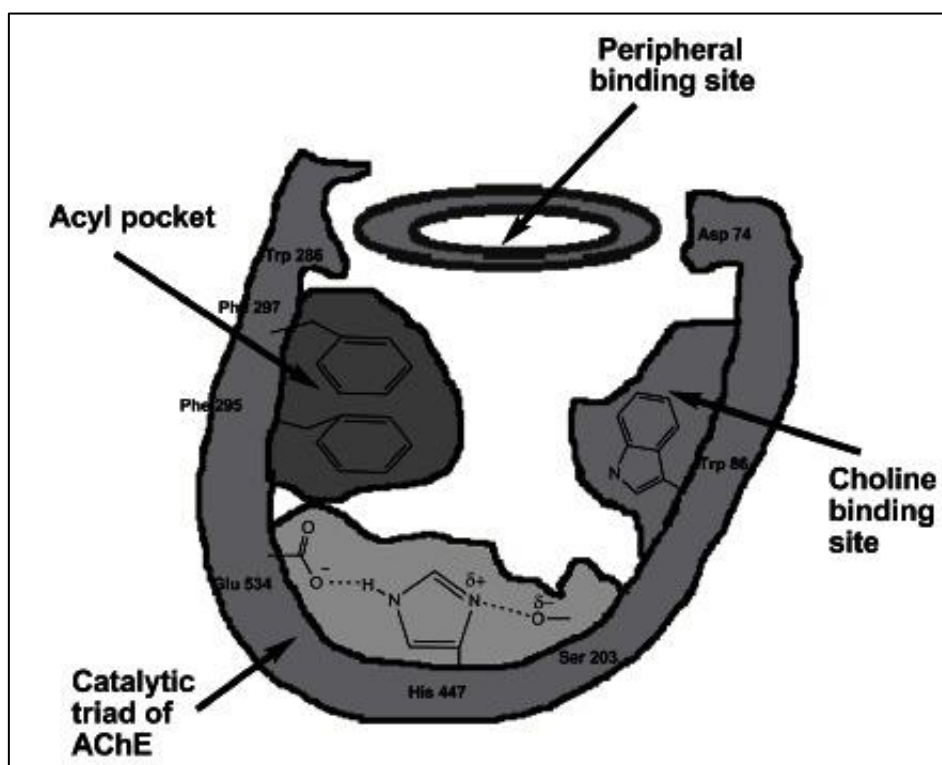
Druhým typem receptorů pro ACh jsou nikotinové receptory (nAChR). Jsou to iontové kanálky, které provádějí transmisi v cholinergním systému. Po navázání agonisty – nikotinu na vazebné místo dochází k otevření kanálku pro ionty a vzniká tak elektrický potenciál. Existují dva podtypy – neuronální a muskulární. Neuronální se nacházejí v nervosvalových ploténkách a propouštějí  $Na^+$ ,  $K^+$  a  $Ca^{2+}$ . Muskulární představují receptory v gangliích (nervových uzlinách) a propouští pouze  $Na^+$  a  $K^+$ . Známým antagonistou nikotinových receptorů je tubokurarin, který má schopnost vytěsnit ACh na nervosvalové ploténce, protože není degradován AChE a tudíž se neotevírají iontové kanálky (Brandlová, 2012).

## 2 Cholinesterasa (ChE)

Tímto termínem se označují enzymy, které hydrolyzují estery cholinu rychleji než jiné estery za optimálních podmínek. V lidském těle to jsou acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BChE) (Jun, Kuča, Patočka, 2004).

### 2.1 Acetylcholinesterasa

Acetylcholinesterasa (AChE) má přesné označení EC 3. 1. 1. 7 a představuje jeden z nejdůležitějších enzymů pro nervový systém. Vyskytuje se v oblastech nervových synapsí a nervosvalových zakončení v centrální nervové soustavě (CNS), kde je důležitý pro přenos nervového vzruchu. Hydrolytickou aktivitou způsobuje degradaci ACh, každá molekula AChE degraduje přibližně 25 000 molekul ACh za sekundu. (Jun, Kuča, Patočka, 2004).



Obrázek 3 Acetylcholinesterasa, (Schematic representation of AChE binding sites, 2013)

Tento enzym se skládá z katalyticky aktivního místa (CAS) a periferního aniontového místa (PAS) (Obrázek 3). V CAS je umístěna esteratická podjednotka s katalytickou triádou aminokyselin skládající se ze serinu (Ser<sup>200</sup>), histidinu (His<sup>440</sup>) a glutaminu (Glu<sup>327</sup>). Anionická podjednotka slouží k navázání kvarterního dusíku ACh a je složena z aminokyselin serinu (Ser<sup>84</sup>), fenylalaninu (Phe<sup>330</sup>) a fenylalaninu (Phe<sup>331</sup>). PAS se nachází ve vstupní části do kavity enzymu a zahrnuje překrývající se vazebná místa pro alosterické aktivátory a inhibitory a má schopnost vázat několik druhů ligandů a tím způsobuje konformace CAS (Paar, 2006).

### 2.2 Butyrylcholinesterasa

Druhým typem ChE je butyrylcholinesterasa BChE, která se nachází v krevní plazmě, játrech, slinivce břišní, střevní sliznici, hladkých svalech a srdci. Její přesné označení je EC 3. 1. 1. 8. BChE štěpí bezoylcholin, ale na rozdíl od AChE nehydrolyzuje D- $\beta$ -methyl acetylcholine. Tento enzym je aktivnější (lépe reaguje) s butyrylem a propionylcholinem než s ACh. BChE v plazmě provádí štěpení esterů cholinu a dalších substrátů. Také hraje důležitou

roli v metabolismu některých dalších sloučenin, např. ametokainu, bupivakainu, kokainu či aspirinu. V dnešní době je BChE testována jako nový terapeutický prostředek pro ochranu proti NPL, aniž by vznikaly nežádoucí vedlejší účinky (Jun, Kuča, Patočka, 2004).

## 3 Inhibitory AChE

Inhibitory jsou obecně látky, které snižují (někdy až blokují) funkci enzymů. Právě tato inhibice patří k nejdůležitějším regulačním mechanismům v živých organismech. Konkrétně u AChE způsobují nahromadění ACh v synaptických štěrbinách, což vede k metabolickým poruchám rovnováhy, slinění, pocení, močení a mimo jiné i k trvalému stahu svalů, které způsobí smrt udušením, protože je staženo dýchací svalstvo (Pohanka, 2014).

Na základě vratnosti efektu se rozdělují na reverzibilní (vratné) a ireverzibilní (nevratné). Reverzibilní inhibitory se váží nekovalentně, tedy slabými vazbami, kdežto u inhibitorů ireverzibilních vzniká trvalá kovalentní vazba. Další možné dělení inhibitorů je na kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní (Pohanka, 2014).

### 3.1 Kompetitivní inhibitory

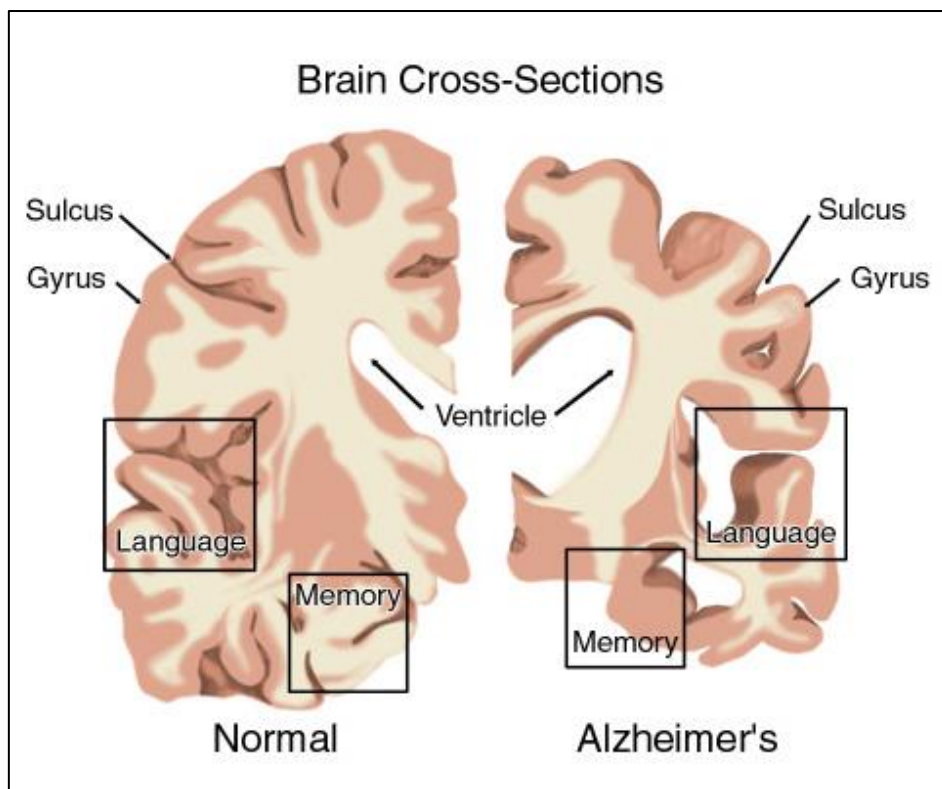
Kompetitivní inhibitor tzv. soutěží s molekulou substrátu o aktivní místo enzymu. Mezi kompetitivní inhibitory AChE se řadí například léčiva používaná v terapii Alzheimerovy choroby (Inhibice enzymů, 2017).

#### 3.1.1 Alzheimerova choroba

Vzájemné působení některých látek nebo léčiv zmíněných v této práci si můžeme přiblížit např. na Alzheimerově chorobě (AD), která představuje neurodegenerativní onemocnění centrální nervové soustavy. O tomto onemocnění často slyšíme ve spojení s amyloidními plaky, nerofibrilárními klubky a poruchami cholinergního přenosu. Příznaky nemoci byly poprvé popsány v roce 1907 německým lékařem Aloisem Alzheimerem. Pacienti postupně více zapomínají, obtížněji hledají slova i pro běžné předměty, hůře rozumí řeči a nastávají změny v chování. Nedochozí ale k poruchám vědomí. Nemocný člověk někdy může působit dojmem jako by trpěl Parkinsonovou chorobou, neboť mohou být postiženy i některé motorické funkce (Hyršová, 2012).

AD můžeme rozdělit na tři stádia – lehká demence, střední stádium demence a těžké stádium demence. Ve stádiu lehké demence se jedná o obtížné dorozumívání, zhoršení artikulace, zapomínání jmen, dezorientace v čase, vztahovačnost, ztráty zájmu o koníčky. Kdežto v těžkém stádiu demence už se jedná hlavně o nerozpoznávání blízkých osob, neschopnosti soustředit se, neschopnost sebeobsluhy a samostatného života, halucinace, poruchy příjmu potravy a její vylučování (Hyršová, 2012).

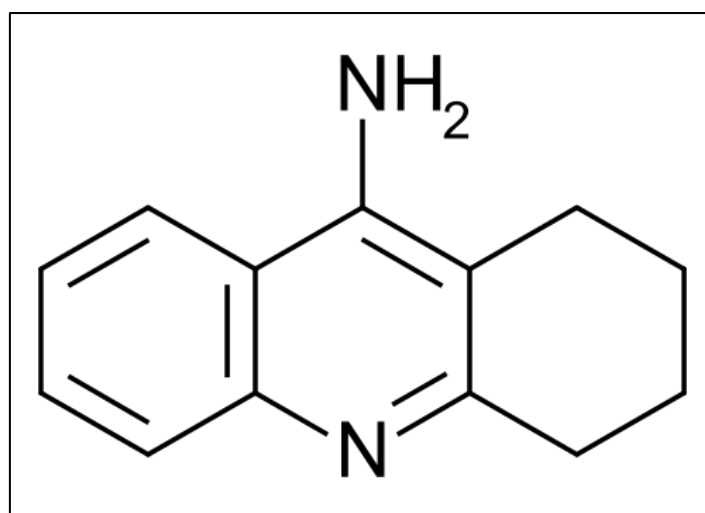
U pacientů trpících AD se objevují větší rýhy hemisfér koncového mozku, zvětšují se mozkové komory, ubývá mozková kůra, zmenšují se gyry. Obvykle nebývá postižen mozkový kmen a mozeček (Obrázek 4). Celková hmotnost mozku může klesnout až na 900 g (normální průměrná hmotnost zdravého mozku je u žen 1 300 g a u mužů 1 400 g). V nervových buňkách a nervové tkáni lze pozorovat také mikroskopické změny, např. senilní plaky s  $\beta$ -amyloidem, úbytek nervových buněk, pokles tvorby neurotransmiterů (především ACh). Také můžeme pozorovat snížení prokrvení mozku a tím i snížení metabolismu kyslíku a glukózy (Hyršová, 2012).



Obrázek 4 Srovnání mozku zdravého člověka s mozem člověka postiženého AD, (Hyršová, 2012)

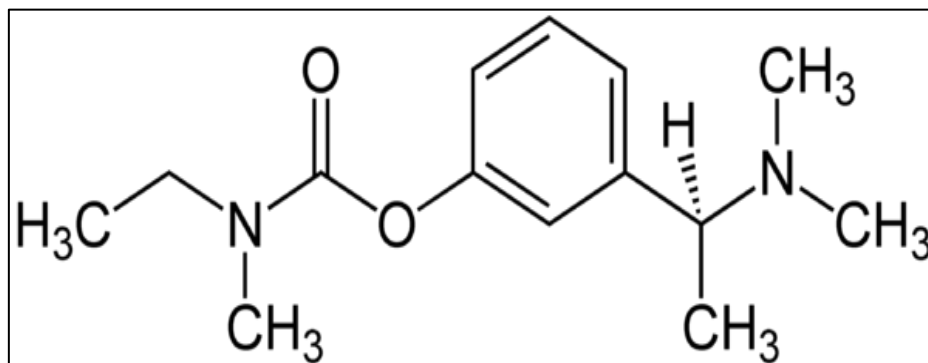
V dnešní době není Alzheimerova choroba vyléčitelná, ale používaná léčiva, tzv. inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI) zlepšují paměťové funkce právě díky cholinomimetické aktivitě. Léčiva jsou založená na zablokování funkčnosti enzymu, který degraduje ACh, tím nedochází ke snižování jeho koncentrace v synaptické štěrbině. Jsou to například – takrin, rivastigmin, donepezil a galantamin (Hyršová, 2012).

Takrin (Obrázek 5) se vyznačuje vyšší selektivitou k BChE. Dnes se již nepoužívá z důvodu závažných vedlejších účinků jako je například hepatotoxicita (látka je toxická pro játra) (Hyršová, 2012).



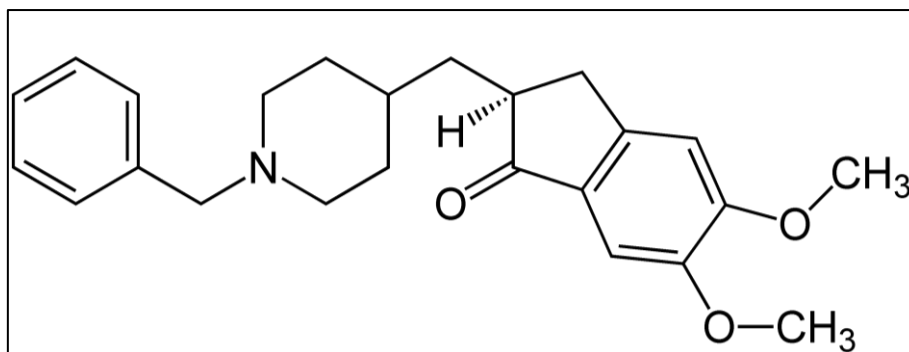
Obrázek 5 Takrin, (Tacrine, 2008)

Používá se rivastigmin (Obrázek 6), derivát karbamové kyseliny, který selektivě působí na mozkovou kůru a na hipokampus a nemá výrazné vedlejší účinky (Hyršová, 2012).



Obrázek 6 Rivastigmin, (Rivastigmin, 2001)

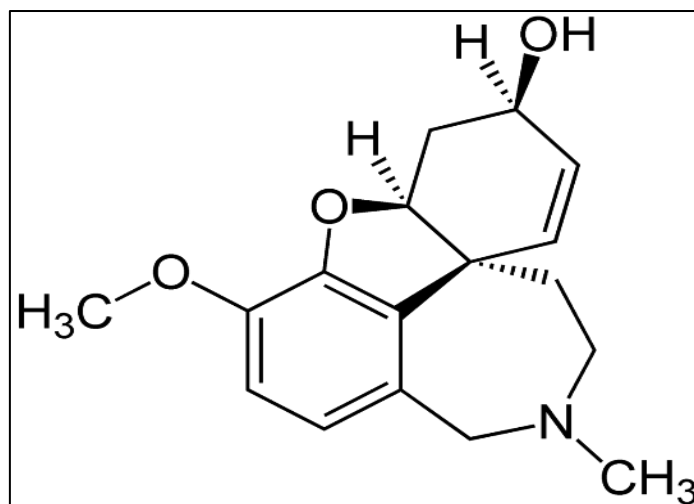
Donepezil (Obrázek 7) představuje dnes nejužívanější léčivo ve střední fázi choroby. Dokáže specificky stimulovat cholinergní systém. Vedlejší účinky se projeví až po dlouhodobém nebo i nadměrném užívání látky (Hyršová, 2012).



Obrázek 7 Donepezil, (Donepezil, 2001)

Galantamin (Obrázek 8) funguje jako modulátor nikotinových receptorů, což prohloubí účinek ACh na ně. Také zvyšuje hladinu kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné a glutamové v CNS. U pacientů, kteří užívají tento druh léčiva se postupně kognitivní funkce zlepšují, zato ale běžné denní činnosti se začnou zhoršovat (Hyršová, 2012).





Obrázek 8 Galantamin, (Galantamin, 2001)

Žádné z uvedených léčiv není zcela ideální. Zatím ve fázi klinických studií jsou například deriváty physostigminu nebo látky odvozené od fenserinu. Vědci také zkouší vhodně nakombinovat aktivní části molekul čtyř výše zmíněných používaných léčiv (Hyršová, 2012).

### 3.2 Nekompetitivní inhibitory

Nekompetitivní inhibitory se váží mimo vazebné místo substrátu a tím dojde ke konformační změně CAS a je tedy omezena či úplně znemožněna vazba substrátu (Inhibice enzymů, 2017).

Mezi nejdůležitější skupiny nekompetitivních inhibitorů acetylcholinesterasy (AChEI) patří karbamáty a organofosfáty (Jun, Kuča, Patočka, 2004).

#### 3.2.1 Karbamáty

Karbamátové inhibitory našly uplatnění jako insekticidy (látky na hubení hmyzu) a také v medicíně jako léčiva. Mezi nejznámější insekticidy patří – karbaryl, karbofuran, aldikarb a fenobukarb. Některé karbamáty jsou velice toxické pro savce včetně člověka. Farmakologicky využívané jsou rivastigmin, pyridostigmin a neostigmin. Kinetika inhibice AChE může být ilustrovaná takto (Obrázek 9) (Jun, Kuča, Patočka, 2004).



Obrázek 9 Reakce AChE s karbamáty, (Jun, Kuča, Patočka, 2004)

Enzym AChE (E) a karbamát (CX) vytvářejí meziproductový komplex (ECX) s disociační konstantou  $K_d$ , která ztrácí odstupující skupinu karbamátu (X) a výsledek této reakce je karbamoylováný enzym (EC) (Jun, Kuča, Patočka, 2004)

#### 3.2.2 Organofosfáty

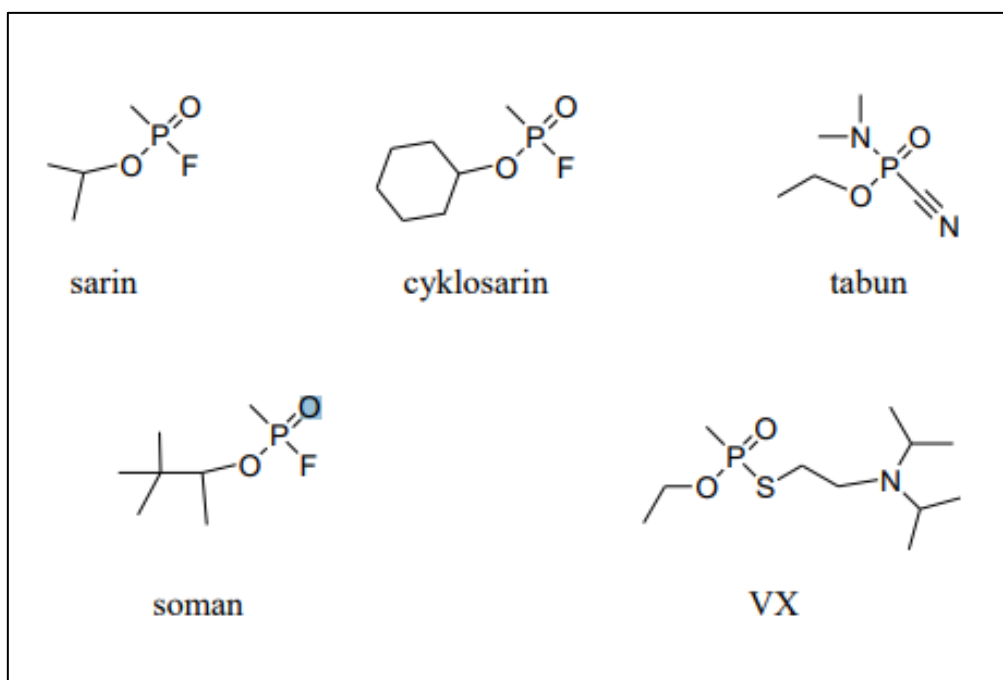
Organofosfátové inhibitory jsou odvozené od kyseliny fosforečné nebo fosfonové. Mají využití v průmyslu a také v zemědělství či lesnictví jako pesticidy (např. malathion, metathion a actellic) v boji proti různým škůdcům. Do těla se dostávají všemi cestami, nejčastěji vdechnutím, požitím a přes kůži. Jediný organofosfát známý v přírodě je anatoxin. Organofosfáty reagují s AChE stejně jako karbamáty a vážou se na hydroxyl serinu v aktivním

centru (Obrázek 10). Na rozdíl od karbamátů je inhibice mnohem silnější a spontánní regenerace AChE může trvat až několik dnů (např. sarin, parathion) (Jun, Kuča, Patočka, 2004).



Obrázek 10 Reakce AChE s organofosfáty, (Jun, Kuča, Patočka, 2004)

Mezi organofosfáty patří také nervově paralytické látky (NPL) (Obrázek 11), které jsou známé svou velkou toxicitou vůči savcům a rychlým účinkem. První vysoce toxické organofosfáty (např. sarin) byly připravovány v Německu a Velké Británii těsně před druhou světovou válkou. V dnešní době představují nejnebezpečnější skupinu chemických zbraní a jedů používaných vojáky, ale také teroristy. Organofosfáty se rozdělují na dvě skupiny – látky G a V. Mezi látky G patří většina NPL. Jsou to: sarin, cyklosarin, soman a tabun. Tyto látky se jeví jako bezbarvé kapaliny, bez velkého zápachu, dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a ve vodě. V terénu vydrží až 24 hodin a to bez ztráty jejich účinku. Druhá skupina (látky V) má jednoho významného činitele – látku VX, která je také bezbarvá, bez většího zápachu a s nižší těkavostí, což znamená, že v terénu vydrží týdny a někdy i měsíce. Je dobře rozpustná v tucích a organických rozpouštědlech (Paar, 2006).

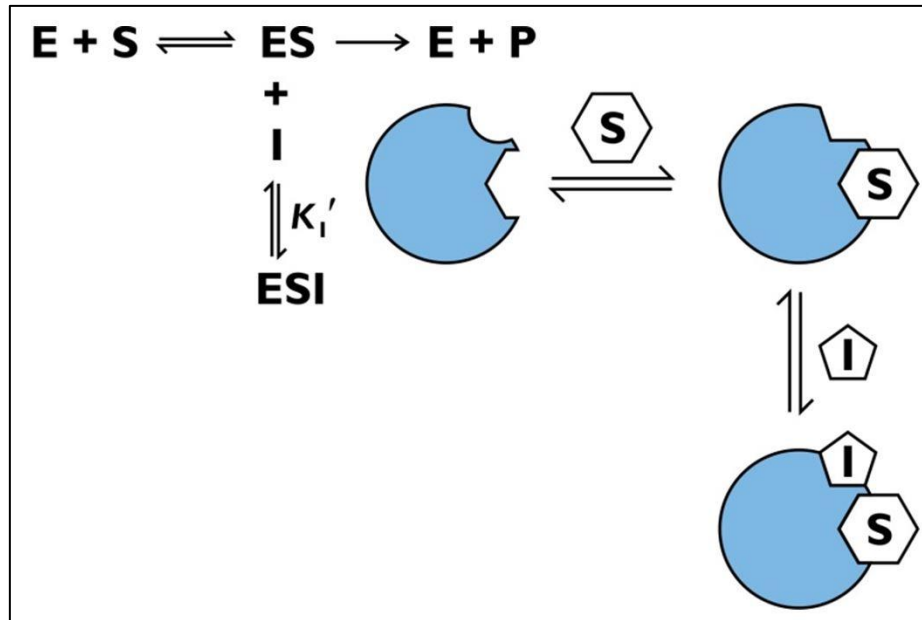


Obrázek 11 Chemická struktura známých NPL, (Paar, 2006)

Účinek těchto nervových činidel je velmi rychlý, proto má včasná první pomoc velký význam. Léčba je velice obtížná, neboť organofosfáty mají rozdílný poločas rozpadu (např. poločas rozpadu somanu je asi 10 minut, sarinu asi 10 hodin a látky VX je více než 24 hodin) (Paar, 2006).

### 3.3 Akompetitivní inhibitory

Akompetitivní inhibice je založená na vaznosti pouze na komplex enzym-substrát a vzniká enzym-inhibitor-substrát (Obrázek 12). Tím je zabráněno jeho přeměně na enzym a produkt (Inhibice enzymů, 2017).



Obrázek 12 Akompetitivní inhibice, (Uncompetitive inhibition, 2013)

U dvousubstrátových reakcí se inhibitor váže na vazebné místo pro druhý substrát, čímž brzdí nebo zastaví průběh reakce. Účinky této inhibice nelze odstranit zvýšením koncentrace substrátu (jako u kompetitivní inhibice), ba naopak je nutné snížit její koncentraci (Inhibice enzymů, 2017).

## 4 Reaktivátory

Aktivita AChE může být obnovena třemi způsoby – syntézou nového enzymu, spontánní reaktivací nebo indukovanou reaktivací. Syntéza *de novo* je velmi pomalá a může trvat až 100 dní. Spontánní reaktivace je založená na reakci inhibovaného enzymu a vody, ve které dochází působením nukleofilu k odštěpení kovalentně vázaného inhibitoru. Pokud je nukleofilem reaktivátor (látka dodaná do organismu), pak označujeme tuto reakci za indukovanou (Paar, 2006).

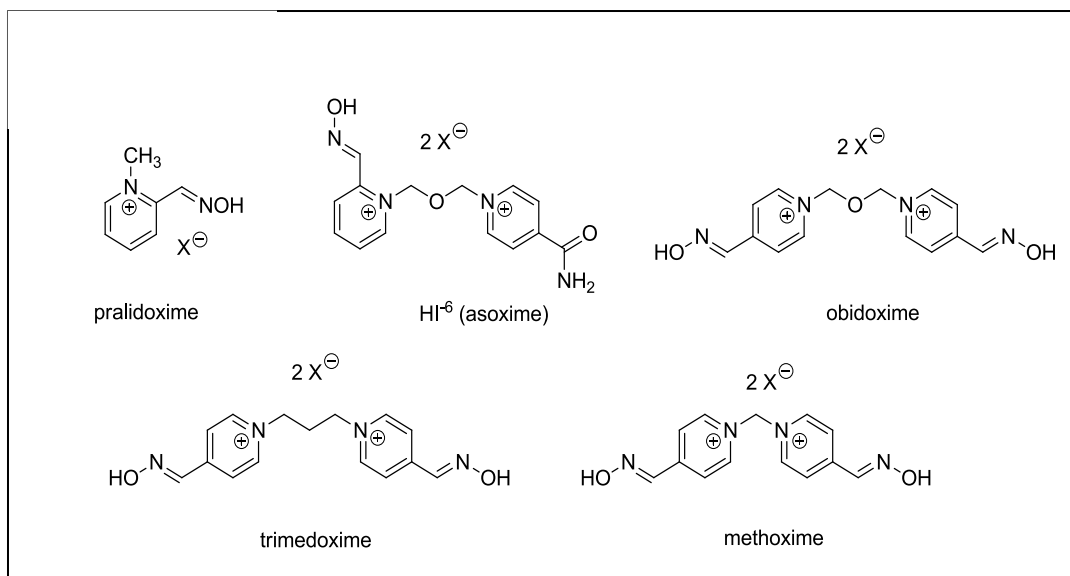
Reaktivátory, někdy nazývané také oximy, protože v molekule obsahují funkční oximovou skupinu (R-CH-NOH), jsou tedy látky, které mají schopnost štěpit vazbu mezi AChE a organofosfátem a následně obnoví (reaktivují) aktivitu enzymu. Představují tedy jeden možný způsob léčby po zasažení organismu NPL (sarin, soman, tabun, látka VX) (Bajgar, 2010).

### 4.1 Kvarterní reaktivátory

Biologickou aktivitu (rychlost, účinnost reakce) ovlivňuje především struktura reaktivátorů. Kvarterní dusíky v molekule zvyšují afinitu k AChE, ale také k inhibovanému enzymu. Podle počtu kladně nabitých dusíků v molekule rozdělujeme monokvarterní (monopyridinové) a biskvarterní (bispyridinové) reaktivátory. Monokvarterní reaktivátor je například pralidoxim a biskvarterní reaktivátory obsahují dva kvarterní dusíky (mají tedy vyšší afinitu k AChE) a jsou to například obidoxima HI-6 (asoxim). Pro vícečetné struktury reaktivátorů hraje významnou roli v jejich vlastnostech také tvar a délka spojovacího řetězce. Vědci tvrdí, že nejvhodnější je tříčlenný nebo čtyřčlenný spojovací řetězec mezi pyridinovými jádry. Účinnost reakce oximů je také bez pochyby závislá na oximové skupině (jejich počtu či poloze) a na mikroprostředí. (Paar, 2006).

Mezi nejznámější oximy patří (Obrázek 13):

- **HI-6** - 1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridini-um)-2-oxapropan dichlorid),
- **obidoxim** - Toxogonin®; 1,3-bis-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropan dichlorid),
- **methoxim**- (MMC, bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)methan dibromid),
- **pralidoxim** - 2-PAM; 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium chlorid) a
- **trimedoxim** - 1,3-bis(4-hydroxyimonomethylpyridinium)propan dobro-mid) (Musílek, 2005).



**Obrázek 13 Chemické struktury kvarterních reaktivátorů, (Soukup, Korabečný, Hepnarová, Jun, Kuča a kol., 2017)**

Neexistuje ovšem univerzální reaktivátor, který by se dal použít proti všem známým NPL. Historicky nejpoužívanějším reaktivátorem NPL je pralidoxim, avšak jeho účinnost na reaktivaci inhibice tabunem a cyklosarinem není dostačující (Bajgar, 2010).

Nejlepším reaktivátorem na tabun byl prokázán trimedoxim (Soukup, Korabečný, Hepnarová, Jun, Kuča 2017).

Mezi nejslibnější reaktivátory se řadí obidoxim a trimedoxim, ale schopnost reaktivovat somanem inhibovanou AChE není dostatečná. Methoxim se zdá být účinný v případě léčby otrav sarinu, cyklosarinu a látky VX, ale není účinný v terapii intoxikací tabunem a somanem. Dnes nejpoužívanější, pravděpodobně i neúčinnější a komerčně nejdostupnější, je reaktivátor HI-6, který má schopnost reaktivovat AChE po otravě NPL, s výjimkou tabunu. Proto se v dnešní době zkoumají další nové reaktivátory, např. HLö-7, K-048 a K203, ale je potřeba u nich ještě provést další preklinický a klinický výzkum. Navíc uvedení nových reaktivátorů do klinické praxe není vůbec levné (Bajgar, 2010).

V nedávné době bylo syntetizováno velké množství nových reaktivátorů označené jako K-substance. Jsou to například K027, K048, K203 a v současnosti u nich probíhá *in vitro* a *in vivo* testování. K207 by v budoucnu mohl nahradit obidoxim, protože má vyšší reaktivací účinnost vůči AChE inhibované tabunem a dokonce i jeho efektivita je vyšší při nižších koncentracích, kterých je po podání léčiv v organismu většinou dosaženo (Kovařík, Vrdoljak, Berend, Katalinic, Kuča, Musílek, Radić 2009).

V minulých letech proběhly podobné experimenty založené na testování nově vyvinutých antidot vůči NPL. V experimentech byly použity laboratorní krysy, na kterých porovnávali nově vyvinuté kvarterní reaktivátory K727 a K733 s obidoximem a HI-6 při inhibici sarinem. Výsledky ukázaly, že zcela nejlepším reaktivátorem je prozatím stále HI-6. Účinnost nových oximů K727 a K733 k reaktivaci AChE inhibované sarinem zhruba odpovídá reaktivací účinnosti obidoximu (Kassa., Šepsová, Matoušková, Horová, Musílek, 2015).

Reaktivací potenciál oximů může být u člověka i u zvířat různý. Z důvodu lepšího zhodnocení účinnosti různých oximů (pralidoxim, obidoxim, HI-6 a K 033) k reaktivaci mozkové AChE inhibované sarinem metodou *in vitro*, byly pro výpočet kinetických parametrů pro reaktivaci použity AChE lidské, potkaní a prasečí. Z výzkumu vyplývá, že oximy K 033 a HI-6 měly vyšší účinek na člověka, prasata a potkany, než používaný pralidoxim. Efektivita

AChE reaktivátorů závisí na jejich schopnosti reaktivovat a afinitě k enzymu, inhibovaného NPL (Kuča, Cabal, Kassa, 2004).

Zkoumaly se také účinky nově vyvinutého oximu K203 v porovnání s dostupnými oximy (obidoxim a HI-6) na potkanech otrávených sarinem. Bylo zjištěno, že účinnost K203 je poměrně nízká a odpovídá přibližně obidoximu. Ve srovnání s HI-6 tak neposkytuje žádný prospěšný účinek pro léčbu otrav sarinem. Tato látka však prokazuje velice dobré výsledky při intoxikaci tabunem (Kassa, Misík, Karasová, 2012).

Také byla prověřena reaktivační schopnost nových oximů K005, K027, K033a K048 s pralidoximem, obidoximem a HI-6 na krysích mozcích. U všech testovaných látek byly pozorovány významné rozdíly v reaktivační účinnosti. Ačkoliv schopnost nově vyvinutých oximů reaktivovat AChE inhibovanou sarinem nedosahovalo reaktivační účinnosti HI-6, potvrdilo se, že látka K033 je účinnější reaktivátor AChE inhibovanou sarinem, než jiné pralidoxim a obidoxim (Kuča, Cabal, Kassa, 2005).

Další studie byla zaměřená na porovnání aktivity ChE za použití trimedoximu, HI-6 a K203. Měření bylo prováděno v krysí krvi, bránici a mozku, zaihibovaných sarinem. Výsledky ukázaly, že K203 je účinnější reaktivátor, než někdy používaný trimedoxim, ale méně účinnější než HI-6 (Kassa, Karasová, Šepsová, Caisberger, 2011).

Z dosud získaných výsledků vyplývá, že existuje několik dobrých léčiv, ale bohužel pomocí nich nelze léčit všechny otravy NPL. Proto se stále vyvíjejí nové látky, což není nikterak jednoduché. Reaktivátor HI-6 představuje nejlepší reaktivátor, protože reaktivuje aktivitu AChE na nejvíce procent na nejširším možném spektru NPL (Kassa, Šepsová, Matoušková, Horová, Musílek, 2015).

## 4.2 Léčba

Při léčbě se tyto antidota podávají ve formě autoinjektorů. V současnosti jsou plněna s atropinem a reaktivátorem. Např. ComboPen obsahuje atropin (2 mg) a obidoxim (110 mg) dohromady v jednom roztoku. Použití HI-6 je omezeno kvůli svému rozkladu v roztoku. Tato situace může být ale jednoduše vyřešena pomocí dvoukomorového autoinjektoru obsahujícího v jedné komoře atropin a ve druhé dichloridovou sůl HI-6, ovšem její rozpustnost však není ideální. Mezi největší výrobce patří švédská firma ASTRA a americká firma STI. Zkoumá se i tříkomorový injektor s atropinem, HI-6 (v prášku) a diazepamem v roztoku, který by představoval optimální zařízení, s jednoduchou manipulací, proti intoxikaci NPL (Bajgar, 2010).

Nejčastěji se reaktivátory podávají v podobě solí (chloridy, bromidy) intramuskulární aplikací. Terapeutická dávka oximů je účinná, pokud zraněnému je podáno správné množství (př. obidoxim 3 mg/kg max 750 mg/24 hod.) (Ševela, Ševčík, Kraus, 2002).

Bylo zjištěno, že nejhůře léčitelná otrava NPL je somanem, protože jeho dealkylace probíhá velice rychle. Naopak nejlépe léčitelná je otrava látkou VX, neboť se vykazuje vysokou stálostí v prostředí a nízkou těkavostí (Bajgar, 2010).

Reaktivátor HI-6 je mimo jiné zahrnut ve vybavení české, slovenské, švédské a kanadské armády jako antidotum proti intoxikaci chemickými zbraněmi (Bajgar, 2010).

Bylo zjištěno, že podání samotného reaktivátoru není tak účinné, proto se v současnosti podává s atropinem, který potencuje jejich antidotní účinky založená reakci AChE na cholinergní látky nervové synapse. (Bajgar, 2010).

## 4.3 Nekvarterní reaktivátory

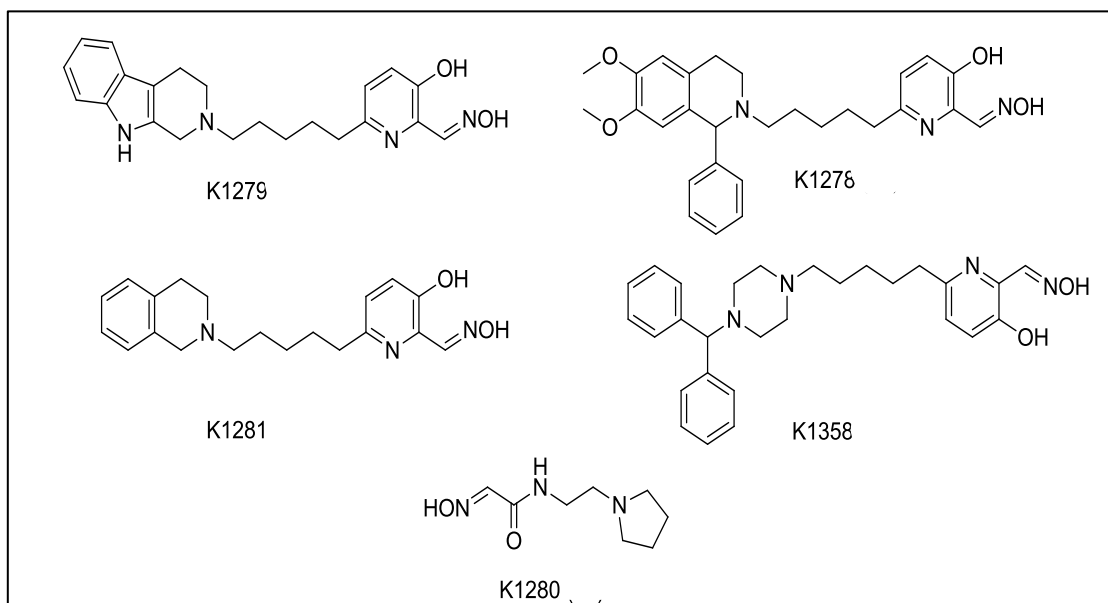
Jedna z možných velice nadějných strategií je vývoj nových centrálně aktivních nekvarterních reaktivátorů, které mohou procházet hematoencefalickou bariérou mnohem účinněji než kvarterní reaktivátory. Toto je také jejich hlavní výhoda, neboť u kvarterních dochází díky přítomnosti kvarterního dusíku k tomu, že přes hematoencefalickou bariéru

prochází reaktivátory AChE typu pyridiniových aldoximů ve sníženém množství. Například monokvarterního pralidoximu prochází do CNS maximálně 10 % a u bispiridiniových oximů se množství ještě snižuje (Sakurada, Matsubara, Shimizu a kol., 2003).

Vzhleden k tomu, že mozek je klíčovým cílem pro toxické působení NPL, je snaha vyvíjet takové reaktivátory, které mají vyšší účinnost reaktivace v CNS. Následkem působení NPL a chybějící účinné terapie je nedostatečná ochrana CNS, což vede k poškození mozku a chronickým neurologickým vedlejším účinkům (bolesti hlavy, depresivní pocity, nedostatečná koncentrace) (Kalisiak, Ralph, Cashman, 2011). Prostup přes hematoencefalickou bariérou závisí na lipofilitě (logP) a rozpustnosti (logS) dané sloučeniny. Důležitou otázkou u nekvarterních reaktivátorů je jejich rozpustnost ve vodě (Kuča, Jun, 2017).

Během posledního desetiletí došlo k rozvoji v syntéze a testování nenabitých reaktivátorů. Mezi testované látky patří např. K1278, K1279, K1280, K1281 a K1358 (Obrázek 14) (Soukup, Korabečný, Hepnarová, Jun, Kuča a kol., 2017).

- **K1278** - 6-(5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyd oxim,
- **K1279** - 6-(5-(3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-2(9H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyd oxim,
- **K1280** - 2-(hydroxyimino)-N-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)ethanamid,
- **K1281** - 6-(5-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyd oxim a
- **K1358** - 6-(5-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyd oxim (Soukup, Korabečný, Hepnarová, Jun, Kuča a kol., 2017).



**Obrázek 14 Chemické struktury vybraných nekvarterních reaktivátorů, (Soukup, Korabečný, Hepnarová, Jun, Kuča a kol., 2017)**

Tyto sloučeniny jsou vysoce lipofilní, což předpokládá jejich dobrý vstup biologickými membránami. Avšak jejich špatná rozpustnost ve vodě a zvýšená toxicita brání účinku léku v organismu. Látka K1280 naproti tomu vykázala nízký rozdělovací koeficient logP (logP = 0,04), avšak dobrou rozpustnost ve vodě (> 41,5 mg v 1 ml), což naznačuje možný slibný výsledek účinnosti v podobě tohoto nekvarterního reaktivátoru. Je tak nutno zvážit, zda

ochrana CNS převáží rizika, spojená s lipofilními sloučeninami (Soukup, Korabečný, Hepnarová, Jun, Kuča a kol., 2017).

Přesto, že byly zjištěny souvislosti mezi vyšší lipofilitou a zvýšenou permeabilitou, nárůst lipofility samo o sobě nezaručuje vždy také nárůst permeability (Avdeef, 2001).

Koncepce nekvarterních reaktivátorů byla původně navržena Mercey a kol., kde se fenyltetrahydroizochinolin vázal do periferního aniontového místa (PAS) AChE a zajišťoval reaktivaci (Mercey, Verdelet a kol., 2011). Probíhající studie ukázaly dobrou až vynikající *in vitro* reaktivací schopnost AChE inhibovanou tabunem a látkou VX (Mercey, Renou a kol., 2012, Renou, Mercey a kol., 2013, Kliachyna, Santoni a kol., 2014, Renou, Loiodice a kol., 2014). Zajímavé ovšem je, že jakmile byl účinek nekvarterních reaktivátorů ověřován u myší, vykazoval stávající nejlepší reaktivátor HI-6 (asoxim) mnohem vyšší účinnost (Callas, Dias a kol., 2017). Z dalších výzkumů vyplynulo, že fenyltetrahydroizochinolinové deriváty mají dobrou reaktivací účinnost *in vitro* ve srovnání s HI-6, obidoximem, trimedoximem a methoximem, v případech, když jsou vázány na imidazolový aldoxime (např. látka RS1947B) (Wei, Liu a kol., 2014).

Dodnes se nevyskytla žádná studie s měřením *in vivo*, která by jednoznačně prokázala použitelnost a účinnost takových sloučenin v klinickém testování (Callas, Dias a kol., 2017).

Z toho důvodu se má práce zabývat testováním *in vivo* a sběrem dat právě v této oblasti.



# PRAKTICKÁ ČÁST

## 5 Materiál a metodika

V praktické části se zabývám měřením aktivity AChE v myší krvi, mozku a bránici. K navození otravy NPL, byl použit sarin a jako léčiva pralidoxim a látka K1280, představující novou testovanou látku. Dále byl všem zvířatům podán atropin, antagonist mACHR, který je používán v klinické praxi.

Krev, mozky a bránice z myší byly odebírány pracovníky z Katedry toxikologie a vojenské farmacie FVZ UO-. S krví se pracovalo ihned po jejím odebrání. Mozky a bránice byly po jejich odběru dány na Petriho misky a vloženy do laboratorního mrazicího boxu. Následně jsem tyto vzorky během podzimu 2017 podrobila výzkumu, v rámci kterého bylo věnováno nespočet hodin nejen přípravné činnosti a samotné práci v laboratoři, ale také následnému zpracování výsledků a tvorbě této práce.

### 5.1 Zvířata

Pokusy probíhaly na samcích myší kmene Balb/C. Myši přebývali v klimatizované místnosti, krmené byli klasickou peletovou dietou a vodou ad libitum.

Zvířata byla rozdělena do 4 skupin po 6 jedincích. Celý experiment probíhal pod záštitou Etické komise Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové a personál manipulující s pokusnými zvířaty byl řádně proškolen a získal osvědčení o způsobilosti pracovat s laboratorními zvířaty podle § 17odst. 1 zákona č. 207/200\*4 Sb., o ochraně, -chovu a využití pokusných zvířat.

### 5.2 Pomůcky

Při práci jsem potřebovala tyto pomůcky – eppendorfy, homogenizér, kádinky, kalkulačtor, kyvety, špachtle, parafilm, Petriho misky, pH metr, pipety + příslušné špičky, rukavice, spektrofotometr, váhy a zkumavky.

Bylo použito cca 50 eppendorfků, 100 kyvet, 8 Petriho misek, 150 špiček na příslušné pipety a 85 zkumavek

Detailní popis všech použitých pomůcek je uveden v Příloze A mé práce.

### 5.3 Příprava použitých roztoků

#### 5.3.1 Tris pufr 0,1 M

Do kádinky jsem odvážila 24,2 g 1,1,1-tris-hydroxymethyl-aminometanu a následně je destilovanou vodou doplnila do 1000,0 ml kalibrované baňky. Tento postup lze také udělat na vahách s tím, že 250 ml se doplní destilovanou vodou na 950 ml (váhy se nesmí vytárovat) a následně se upraví pH na 7,6 pomocí HCl (vhodné je pH upravit na 7,58 a po doplnění na 1000,0 se pH trochu zvedne) a poté doplnit na 1000,0 ml.

#### 5.3.2 Tris pufr 0,02 M

Do 600 ml kádinky jsem nalila 100,0 ml 0,1M tris pufru a destilovanou vodou doplnila do 450,0 ml. Následně bylo upraveno pH (na 7,6) a objem doplněn do 500,0 ml destilovanou vodou.

### **5.3.3 HCl**

V poměru 1:1 se nalije koncentrovaná kyselina do vody. Pokud se kyselina chlorovodíková používá jen k úpravě pH, stačí dané množství nalít v daném poměru tzv. „od oka“.

### **5.3.4 Acetylthiocholin**

Do 10 ml zkumavky jsem pomocí pipety přenesla 1 ml acetylthiocholinu a množství doplnila destilovanou vodou do 10 ml.

### **5.3.5 DTNB**

Na laboratorní váze jsem odvážila 0,1 g práškového DTNB, vložila do odměrné baňky a množství doplnila k rysce 0,1 M pufrům. Roztok je citlivý na světlo, uchovávali jsme ho tedy ve skle krytém alobalem.

### **5.3.6 Směs (DTNB + 0,1 M pufr)**

Na laboratorní váhu jsem položila nádobu a její hmotnost vytárovala. Poté jsem do nádoby nalila DTNB, opět vytárovala a následně dopočetala, kolik je potřeba dolít 0,1 M pufru tak, aby výsledný roztok byl v poměru 135 (0,1 M pufr) : 40 (DTNB).

V mém případě jsem přidávala  $\pm 20$  g DTNB a  $\pm 65$  g 0,1 M pufru.

## 5.4 Postup měření aktivity AChE

Celkem se měřily čtyři sledované skupiny myši (Tabulka 1). V každé skupině jednotlivých orgánů bylo šest vzorků.

Tabulka 1 Skupiny měření, (autorka, 2017)

	MYŠ
1. skupina	fyziologický roztok za 1 minutu atropin (10 mg/kg)
2. skupina	sarin (1 LD <sub>50</sub> = 135 µg/kg) za 1 minutu atropin (10 mg/kg)
3. skupina	sarin (1 LD <sub>50</sub> = 135 µg/kg) za 1 minutu atropin (10 mg/kg) + pralidoxim chlorid (85 mg/kg)
4. skupina	sarin (1 LD <sub>50</sub> = 135 µg/kg) za 1 minutu atropin (10 mg/kg) + K1280 (100 mg/kg)

*Pozn. LD<sub>50</sub> je označení pro dávku látky, která způsobí úhyn 50 % testovaných jedinců do 24 hodin od podání. Navržení dávkovacího schématu pokusu nebylo součástí mé práce, ale navazovalo na řešení grantu, získaného pracovníky KTVF.*

První experimentální skupina byla určena jako kontrola, neboť byl přidán pouze fyziologický roztok s atropinem. Naměřená hodnota této skupiny je chápána jako 100 % aktivity AChE. Ve druhé skupině byl myšim podán sarin, který sloužil k inhibici AChE v daném vzorku. Myši byli infikované sarinem na příslušné oddělení KTVF FVZ UO, následně preparovány a označené vzorky krve, mozku a bránice ke každé myši byly dodány obratem k nám do laboratoře na následný výzkum. Ve třetí skupině byl k sarinu a atropinu přidán pralidoxim chlorid, což je monokvartérní reaktivátor, který se používá jako léčivo při otravách nervově paralytickými látkami. V poslední skupině byla místo pralidoximu přidána nová testovaná látka K1280, představující nekvarterní reaktivátor.

### 5.4.1 Stanovení aktivity cholinesteras v krvi

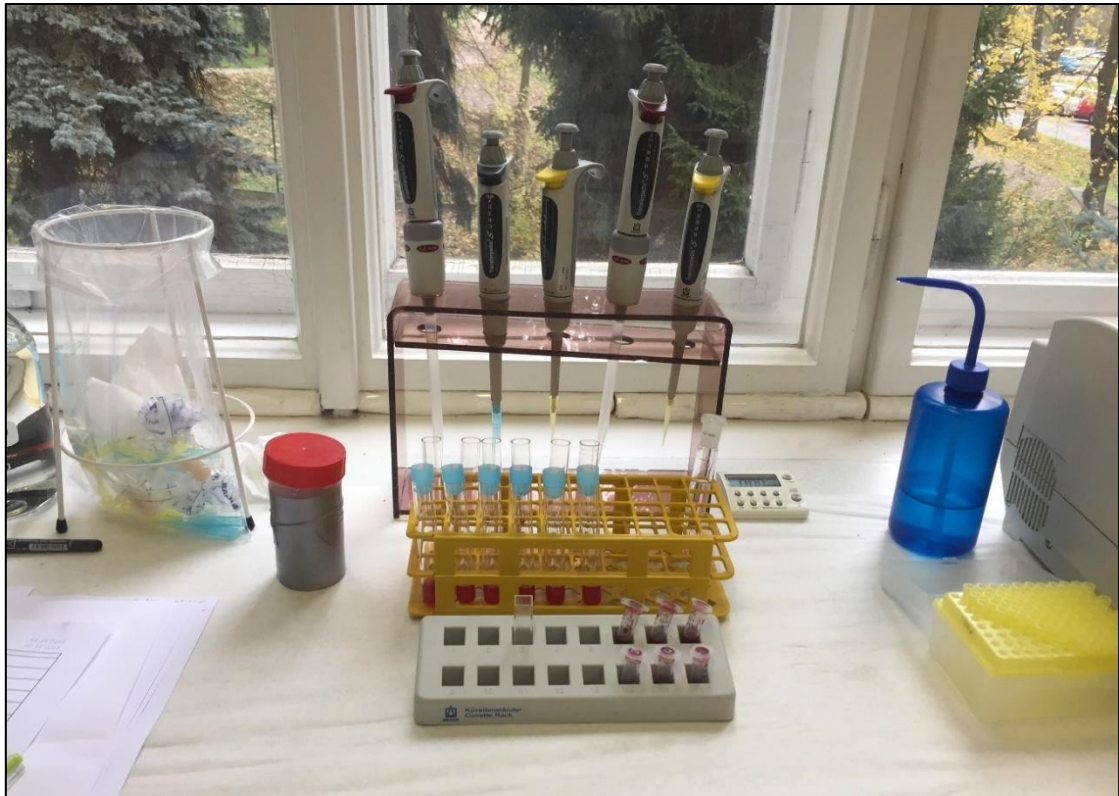
Krev z myši byla odebírána na jiném oddělení Katedře toxikologie a vojenské farmacie FVZ UO v Hradci Králové a předána k nám do laboratoře, kde byly ihned tyto vzorky krve analyzovány (Obrázek 15).



Obrázek 15 Odebraná myší krev v eppendorfci, (autorka, 2017)

Níže v textu uvádím přesný postup při měření aktivity AChE v krvi. Odebraná krev v eppendorfkách byla nejdříve zhemolyzována. Hemolýza je rozpad červených krvinek, během kterého se uvolňuje hemoglobin (červené krevní barvivo). Z eppendorfky s krví (z myši č. 1) bylo pipetou odebráno 100  $\mu$ l krve a přidáno o zkumavky č. 1 s 1,9 ml tris pufru 0,02 M s pH 7,6. Pro úplné odstranění krveze špičky pipety se aspoň jednou natáhne vzniklá směs ze zkumavky a opět vypustí. Následně se daná zkumavka položí na Lab dancer (míchadlo) a tím se látky zcela promíchají. Poté se počká cca 2 minuty, aby se krev pročeřila (tj. zhemolyzovala). Mezitím se připraví kyveta, do které se pipetou přenes 1,7 ml směsi DTNB + 0,1 M pufru, 100  $\mu$ l látky ze zkumavky č. 1 a 200  $\mu$ l acetylthiocholinu. Následně se kyveta přikryje parafilmem, promíchá a vloží do spektrofotometru, na kterém je předem připraveno měření aktivity AChE v myší krvi. Daná kyveta je ve spektrofotometru celkem 5 minut (nejprve 4 minuty jen „leží“ a zbylou 1 minutu probíhá samotné měření). Po uplynulých pěti minutách se zobrazí výsledky a do protokolu zapíše změnu absorbance za minutu ( $\Delta A/\text{min}$ ).

Tento postup se provede vždy dvakrát u každého vzorku (Obrázek 16). Pokud se naměřené hodnoty lišily, bylo třeba měření provést znovu.



Obrázek 16 Měření aktivity AChE v krvi, (autorka, 2017)

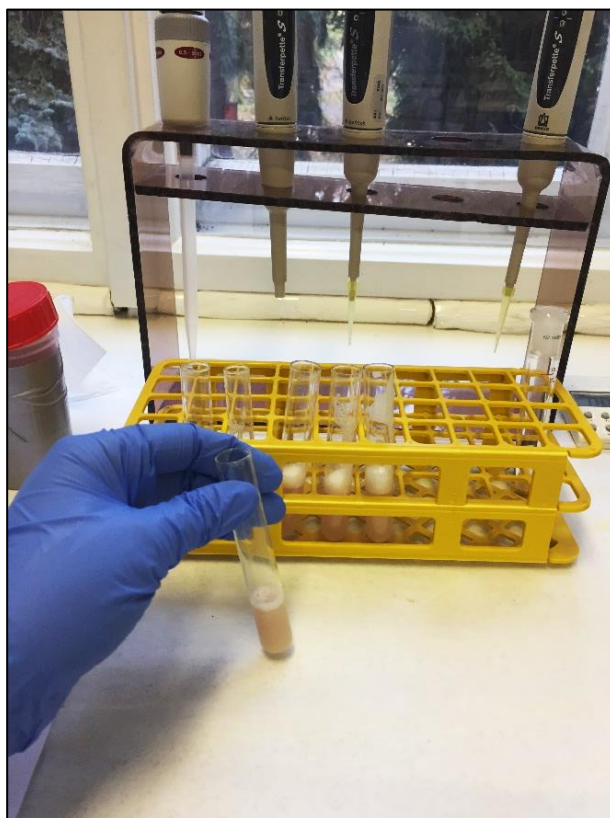
#### 5.4.2 Stanovení aktivity cholinesteras v mozku

Myší mozky byly preparovány a odebírány krátce po aplikování daných látek z příslušných skupin. Uchovávaly se na Petriho misce v laboratorním mrazícím boxu při cca -80 °C až do dne měření (Obrázek 17).



Obrázek 17 Myší mozky, (autorka, 2017)

V následujícím textu je uveden postup, který byl použit v tomto projektu. Nejprve se vezme myší mozek, zváží se (hmotnost mozku je cca 0,400 g) a vloží do zkumavky č. 1. Poté dochází k naředění daného vzorku 10x 0,02 M pufrem s pH 7,6 ve zkumavce č. 1. Následně se mozek zhomogenizuje („rozdrtí“) v homogenizátoru (Obrázek 18). Nesmí se zapomenout zkontrolovat, zda je mozek zcela rozdrcena ve zkumavce nejsou hrudky, aby nedošlo k nepřesnosti měření. Poté se připraví kyveta, do které se napipetuje 1,7 ml směsi DTNB + 0,1 M pufru, 100  $\mu$ l látky z dané zkumavky, 200  $\mu$ l acetylthiocholinu, následně se kyveta přikryje parafilmem, protřepe a vloží do spektrofotometru (na kterém je nastaveno měření myších mozků). Doba měření v přístroji je celkem tři minuty (z toho dvě minuty vzorek v přístroji „leží“ a jednu minutu probíhá samotné měření). Po dokončení nastaveného měření se zobrazí výsledky a jsou zapsány do protokolu. Následně se celý proces provede na každém vzorku ještě jednou (tj. každý vzorek je testován dvakrát).



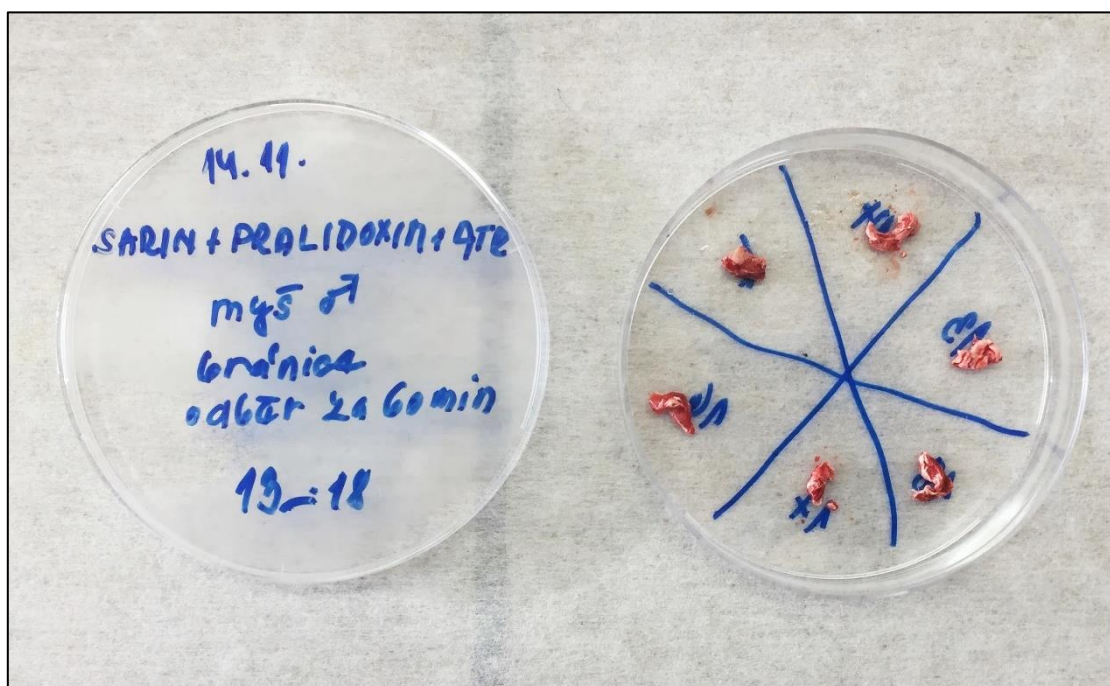
**Obrázek 18** Zhomogenizované mozky, (autorka, 2017)

Takto se postupuje se všemi mozky z myšič. Celkem jsem měřila 4 skupiny mozků po šesti vzorkách vždy dvakrát. Pokud se naměřené hodnoty výrazně lišily, bylo zapotřebí měření provést znovu.

### 5.4.3 Stanovení aktivity cholinesteras v bránici

Bránice myši všech sledovaných skupin byly uloženy v laboratorním mrazicím boxu při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  (Obrázek 19). Postupně jsem vzorky po jednom z mrazicího boxu vytahovala a vážila (hmotnost bránice je zhruba 0,060 g). Následně jsem v závislosti na hmotnosti bránice spočítala množství 0,2 M pufru s pH 7,6, které je potřeba přidat do zkumavky č. 1 s bránicí vzorku č. 1, aby došlo k desetinasobnému naředění.

V následujícím odstavci je uveden postup, který byl použit v tomto projektu. Obsah zkumavky č. 1 se zhomogenizuje na homogenizátoru. Je nutné klást důraz na to, aby vzniklá látka ve zkumavkách byla dokonale zhomogenizovaná (tj. rozdrčená bez hrudek), jinak hrozí nepřesná měření. Poté se připraví kyveta, do které se dá 1,7 ml směsi DTNB + 0,1 M pufru, 100  $\mu\text{l}$  látky ze zkumavky č. 1 a 200  $\mu\text{l}$  acetylthiocholinu, následně přikryje parafilmem, promíchá a vloží do spektrofotometru, na kterém je připraveno měření myších bránic. Prvních osm minut kyveta „leží“ ve stroji a až po uplynutí těchto osmi minut začne samotné měření, které trvá dvě minuty. Po doměření aktivity AChE v bránici se výsledek zapíše do tabulky, kyveta ze spektrofotometru vyndá, obsah kyvety vylije, vyčistí destilovanou vodou a měření tohoto vzorku se provede pro kontrolu znovu.



Obrázek 19 Myší bránice, (autorka, 2017)

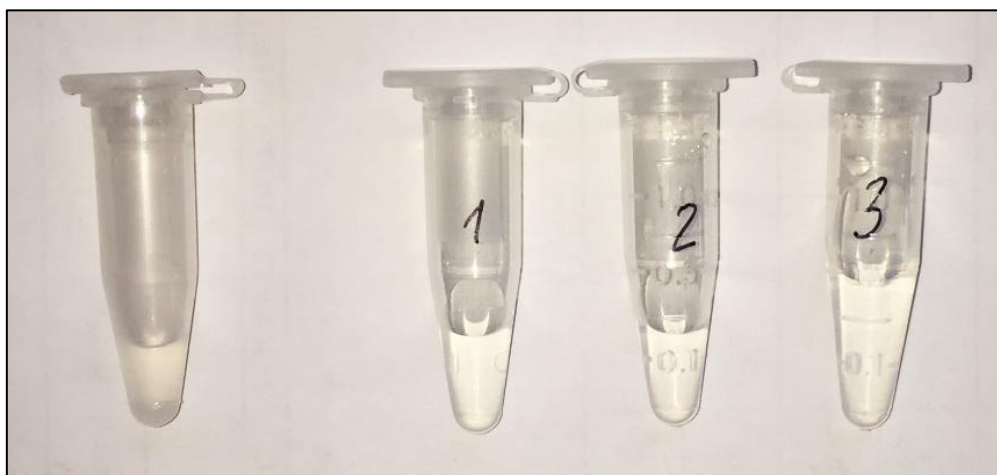
Podle výše uvedeného postupu jsem měřila celkem dvacet čtyři vzorků bránic myší. (vždy šest vzorků ze čtyř skupin). Při nepřesném měření jsem měření zopakovala.



#### 5.4.4 Kalibrace spektrofotometru

Při každém měření vzorku je provedena kalibrace, protože se tak eliminují odlišnosti přípravy jednotlivých roztoků a zajistí maximální přesnost měření.

Níže uvádím přesný postup kalibrace spektrofotometru použitý v této práci. Z lednice se vyndá cystein a připraví tři eppendorfky, do kterých se bude postupně ředit cystein. Do všech tří eppendorfek se dá 500  $\mu$ l vody a dále se bude ředit tak, že se do pipety nabere 500  $\mu$ l cysteinu a přenesse do eppendorfky č. 1. Nechá se chvíli promíchat na Lab danceru (míchadlu), následně se vezme 500  $\mu$ l vzniklé látky (z eppendorfky č. 1) a přenesse do eppendorfky č. 2. Poté se vše promíchá, nabere se 500  $\mu$ l z eppendorfky č. 2 a přepipetuje do eppendorfky č. 3 s opětovným promícháním. Vytvoří se tak koncentrační řada cysteinu o maximální koncentraci 0,2 M (Obrázek 20).



Obrázek 20 Koncentrační řada cysteinu, (autorka, 2017)

Nyní se připraví dvě kyvety, do obou vložíme 1,7 ml směsi DTNB + 0,1 M pufru a 300  $\mu$ l destilované vody. Tyto dvě kyvety se vloží do spektrofotometru, ve kterém se proměří jejich spektrum. Jedna kyveta se vloží do prostředního držáku a druhá do zadního držáku. Kyveta musí být v držáku umístěna správně (tj. aby paprsek spektrofotometru mohl procházet přes čiré strany kyvety). Pro zahájení kalibrace se na přístroji stiskne tlačítko RUN. Po několika sekundách přístroj na displeji vykreslí bod [0,0] na grafu. Kyveta, která byla umístěna v prostředním držáku, se vyndá s tím, že její obsah se vyleje do biologického odpadu, promyje destilovanou vodou a okape. Do kyvety se následně napipetuje 1,7 ml směsi DTNB + 0,1 M pufru, 100  $\mu$ l destilované vody a 200  $\mu$ l látky z eppendorfky č. 3 (nejméně koncentrované). Následně se tato kyveta umístí do prostředního držáku stroje (ve stroji je stále kyveta pouze se směsí DTNB + 0,1 M pufru a destilovanou vodou). Stroj opět vykreslí bod. Tento postup je stejný i s eppendorfkou č. 2 a č. 1 a samotným cystinem. Jakmile máme změřené všechny vzorky, na displeji stroje je vykreslená křivka a pod ní se nachází hodnota, kterou si zapíšeme pod tabulku v protokolu (pozn. hodnota by měla vyjít kolem 1,000).

Tímto je kalibrace spektrofotometru hotová.

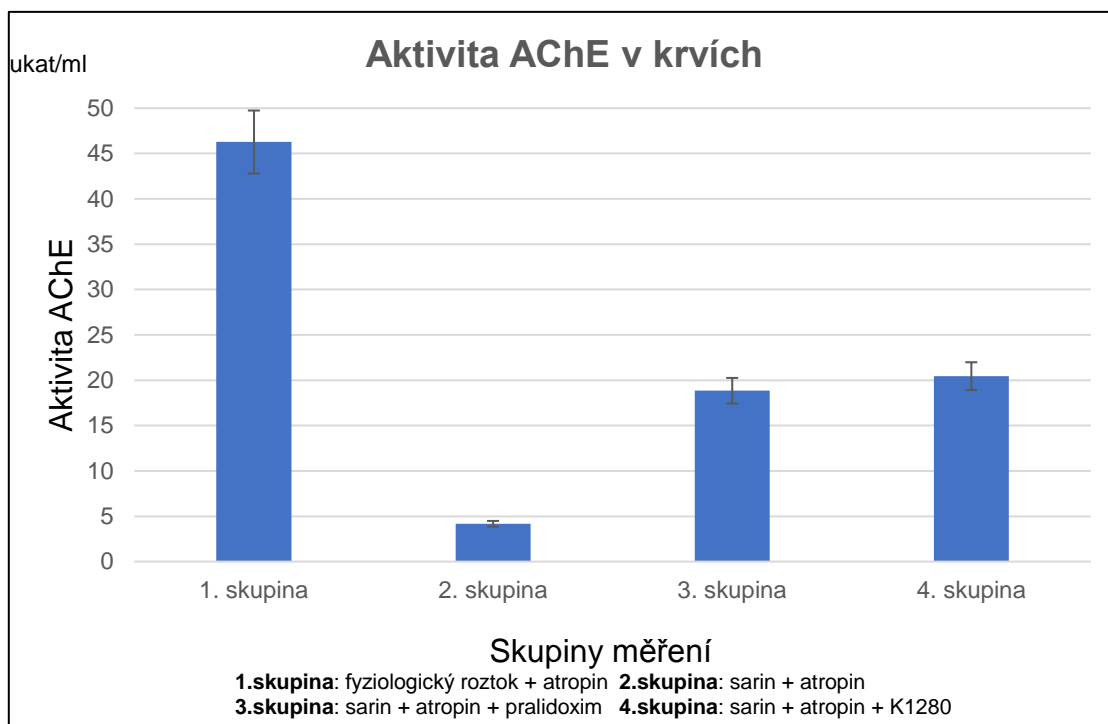
## 5.5 Výsledky

Hlavní výsledky této práce byly získány v laboratořích v prostorech Katedry toxikologie a vojenské farmacie FVZ UO na podzim roku 2017.

Celkem bylo změřeno sedmdesát dva myších vzorků (dvacet čtyři vzorků krví, dvacet čtyři vzorků mozků a dvacet čtyři vzorků bránic) předem rozřazených do čtyř skupin aplikovaných látek. První experimentální skupina byla určena jako kontrola, neboť byl přidán pouze fyziologický roztok s atropinem. Naměřená hodnota této skupiny je chápána jako 100 % aktivity AChE. Ve druhé skupině byl myšim podán sarin, který sloužil k inhibici AChE v daném vzorku. Ve třetí skupině byl k sarinu atropinu přidán pralidoxim chlorid, což je monokvartérní reaktivátor, který se používá jako léčivo při otravách nervově paralytickými látkami. V poslední skupině byla místo pralidoximu přidána nová testovaná látka K1280, představující nekvarterní reaktivátor.

### 5.5.1 Aktivita AChE v krvích pozorovaných myší

Ze získaných výsledků měření byl vypracován následující graf, ve kterém je znázorněna aktivita AChE v jednotlivých skupinách za použití spektrofotometrické metody.



Graf 1 Aktivita AChE v krvích, (autorka, 2017)

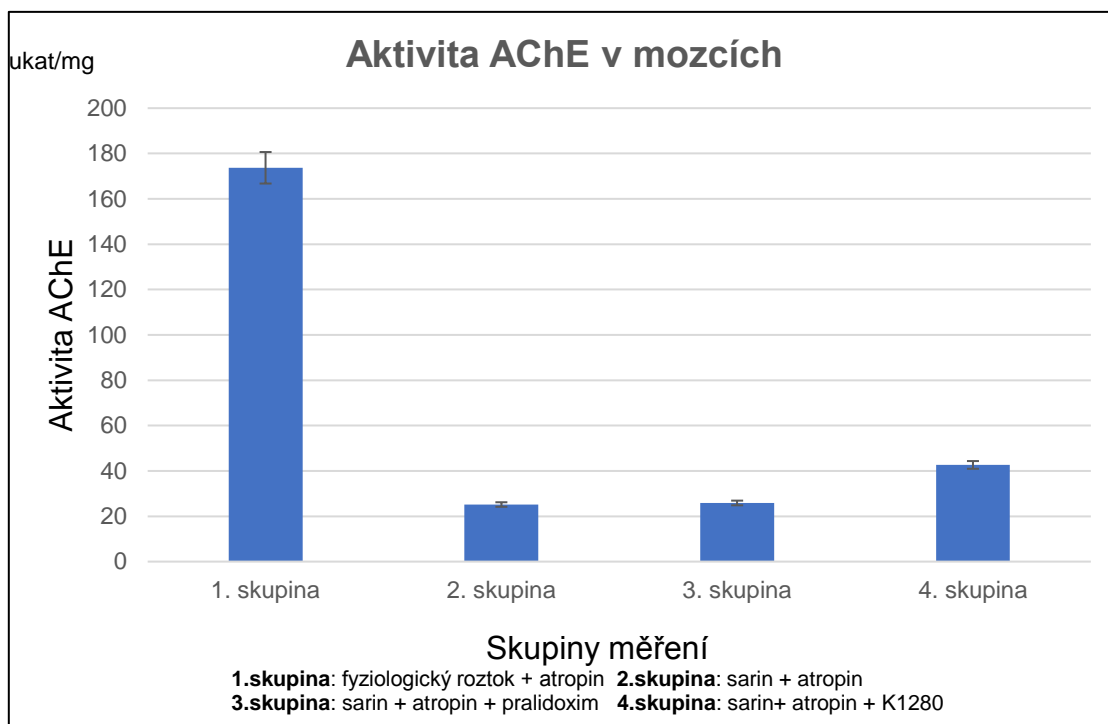
Z grafu č. 1 je zřejmé, že největší aktivitu AChE v krvi měla 1. skupina myší při podání fyziologického roztoku. Sloupec druhé skupiny ukazuje nejnižší aktivitu, což bylo i předem předpokládáno, neboť u této skupiny byla AChE inhibována sarinem. Sloupec čtvrté skupiny je nepatrně vyšší, než sloupec třetí skupiny, z čehož lze usoudit, že nová testovaná látka K1280 v krvi lépe reaktivuje procesy (naměřená hodnota byla 38,67 %), než dosud používaný pralidoxim, který aktivitu obnovil na 34,85 %. Procenta jsou vypočtena dle následující rovnice (Rovnice).

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

$\Delta A_0$  vyjadřuje změny absorbance neinhibované AChE (fyziologický roztok byl použit místo roztoku inhibitoru),  $\Delta A_i$  vyjadřuje změny absorbance inhibované AChE a  $\Delta A_r$  vyjadřuje změny absorbance reaktivované AChE.

### 5.5.2 Aktivita AChE v mozcích pozorovaných myší

Z naměřených hodnot byl vyhodnocen následující graf, ve kterém je znázorněna aktivita AChE v jednotlivých skupinách myší.

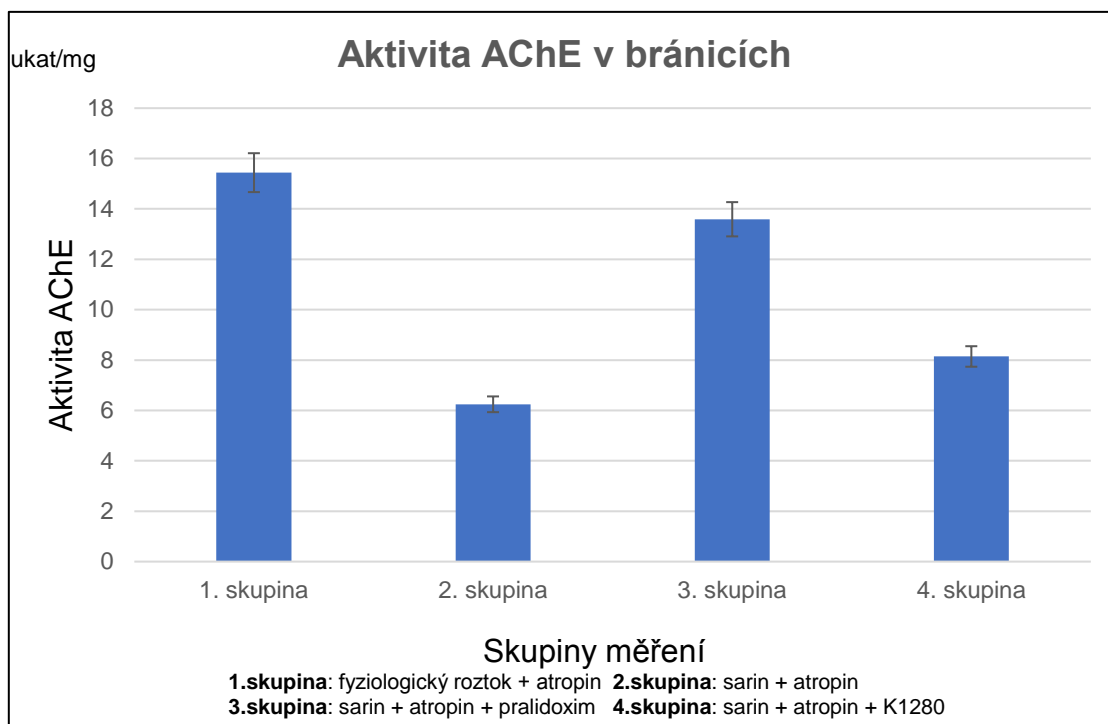


Graf 2 Aktivita AChE v mozcích, (autorka, 2017)

Stejně jako při měření aktivity AChE v krvi, byla největší aktivita AChE zjištěna u první skupiny, tedy s fyziologickým roztokem, který budeme brát jako 100 % aktivity AChE. Ukázalo se, že při otravách sarinem dokáže pralidoxim v mozku aktivitu zreaktivovat pouze na 0,46 %. Oproti tomu látka K1280 dokázala aktivitu obnovit na 11,63 %.

### 5.5.3 Aktivita AChE v bránicích pozorovaných myší

Z výsledků jsem vyhodnotila následující graf, znázorňující aktivitu AChE v jednotlivých skupinách.



Graf 3 Aktivita AChE v bránicích, (autorka, 2017)

Největší aktivita AChE byla opět zjištěna u první skupiny myší, kterým byl podán pouze fyziologický roztok. Nejnižší aktivita AChE byla zjištěna u druhé skupiny, což bylo i předpokládané, protože myši byly zainhibované sarinem (bez podání reaktivátoru). Třetí sloupec je vyšší než čtvrtý, z toho vyplývá, že pralidoxim je lepší reaktivátor při otravě sarinem v bránicích a dokázal obnovit aktivitu na 79,88 %, zatímco K1280 obnovila aktivitu pouze na 20,64 %.

## 5.6 Vyhodnocení výsledků

Při vyhodnocení výsledků daného *in vivo* pokusu jsem zjistila, že nová testovaná látka K1280, jako nekvartérní reaktivátor, nejlépe působí v krvi (dokázala obnovit aktivitu na 38,67 %). Zato nejhůře působí v mozku, kdy naměřená aktivita AChE byla pouze 11,63 %, avšak tato hodnota přesahuje již výše zmíněných 10 %, kterých dosahují standardní kvarterní reaktivátory.

Kvarterním reaktivátorem v této práci byl zvolen pralidoxim, který nejlépe také působí v bránicích (zreaktovaná hodnota byla 79,88 %). Na 34,85 % se aktivita AChE obnovila v krvi a nejhůře pralidoxim působí v mozku, kdy naměřená hodnota byla pouze 0,46 %.

Za velice překvapující můžeme považovat měření aktivity AChE v bránicích. Látka K1280 neobnoví aktivitu AChE natolik, jako používaný pralidoxim. U měření aktivity AChE v myší krvi a mozcích byla vždy naměřená hodnota aktivity AChE s K1280 vyšší než aktivita AChE s pralidoximem.

## Diskuse

NPL (sarin, cyklosarin, soman, tabun, látka VX) představují celosvětově extrémně toxické sloučeniny, které se využívají jako chemické zbraně, zbraně hromadného ničení, při různých teroristických útocích. Například sarin byl použit při teroristickém zásahu tokijském metru v roce 1995, při kterém zemřelo 13 lidí a tisíce skončily v péči lékařů. Látka VX nese inu na atentátu, spáchaném v únoru 2017, na Kim Jong – nama, bratra severokorejského dikátora Kim Jong-una. Tyto chemické zbraně byly také použity při Válce v Zálivu, válkách v Sýrii a dalších asijských zemích (Soukup, Korabečný, Hepnarová, Jun, Kuča, 2017).

Jakmile NPL pronikne do těla živého organismu, dochází k akumulaci AChE (tj. enzymu, který je důležitý pro přenos nervového vzruchu) v oblastech nervových synapsí a nervosvalového zakončení. U intoxikovaného člověka nastávají příznaky v podobě slinění, pocení, rozmazaného vidění, svalové slabosti. Pokud se tyto otravy včas neprokáží a není zahájena léčba, NPL inhibují dýchací centrum, což může vést až k usmrcení (Pohanka, 2014).

V dnešní době existuje řada kvarterních reaktivátorů (HI-6, pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, methoxim) s tím, že ani jeden ze současně známých reaktivátorů není schopný kompletně reaktivovat aktivitu AChE po intoxikaci kteroukoliv NPL. Z toho důvodu se stále vyvíjejí a zkoumají nové látky (Soukup, Korabečný, Hepnarová, Jun, Kuča, 2017).

V poslední době se začal vyvíjet směr nekvarterních reaktivátorů. Tyto látky by měly zvýšit účinnost reaktivity v CNS, což je hlavním nedostatkem kvarterních reaktivátorů, které z důvodu pozitivně nabitého dusíku ve své molekule mají omezenou prostupnost skrze hemoencefalitickou bariéru a tedy i nižší schopnost obnovit aktivitu AChE v CNS. Proto probíhá v mnoha laboratořích testování nekvarterních reaktivátorů (Soukup, Korabečný, Hepnarová, Jun, Kuča, 2017).

Z tohoto důvodu dochází u osob, vystavených působení NPL, k rozvoji poruch CNS, především k chronickým neuronálním poruchám. Proto je jednou ze slibných nadějí vývoj nových centrálně aktivních nekvarterních reaktivátorů, které by mohly účinněji procházet hematoencefalickou bariéru. Existuje však také domněnka o možných nedostatcích těchto reaktivátorů ve vztahu farmakologickému, fyzikálně-chemickému a toxikologickému původu (Kuča, Jun, 2017).

U nekvarterních reaktivátorů se setkáváme s negativním jevem už při jejich syntéze. Oproti kvarterním reaktivátorům vyžadují delší čas přípravy (vzhledem k charakteru jejich molekuly, obsahující jeden nebo dva kladně nabitě atomy), což ve výsledku přináší nižší výtěžky reakcí a tím delší časy syntézy potřebného množství (Musílek, 2017).

V mé práci jsem se plně zabývala *in vivo* testováním látky K1280, jakožto jednoho ze zástupců skupiny nekvarterních reaktivátorů. Přestože látka K1280 neprokázala v předešlém testování *in vitro* uspokojujících výsledků, byla jako jediná rozpustná a mohla se tak aplikovat v organismu zvířat.

Podle naměřených výsledků v tomto projektu z hlediska měření *in vivo* se nedá přesně určit, který reaktivátor je účinnější. Výsledky v krvi ukázaly, že K1280 reaktivuje procesy na 38,67 %, zatímco pralidoxim pouze na 34,85 %. Při měření aktivity AChE v mozku vyšlo také, že K1280 je účinnější než pralidoxim (pralidoxim zreaktivoval aktivitu na 0,46 %, kdežto K1280 na 11,63 %). Z výsledků z bránic vyplývá, že účinnější reaktivátorem je pralidoxim, neboť zreaktivovaná aktivita byla 79,88 %, oproti tomu u látky K1280 pouze 20,64 %. V *in vivo* testování v krvi a mozku je reaktivátor K1280 účinnější, tedy prostupuje přes membrány lépe. Avšak v testování bránic K1280 neprokázala lepší výsledek než standardní pralidoxim. K1280 by mohla být zřejmě účinnějším reaktivátorem oproti pralidoximu pouze za předpokladu vylepšení fyzikálně-chemických vlastností.

V dřívějších výzkumech probíhalo testování látky K1280 *in vitro*. Jedním z testů bylo zjištění účinnosti reaktivity AChE inhibované sarinem. V tomto testu dosáhla pouze 3 %

reaktivační účinnosti, avšak při testování *in vivo* prokázala poměrně vysokou účinnost. Z těchto získaných výsledků lze usoudit, že mechanismus účinku této látky nebude zřejmě zcela totožný s klasickými kvarterními reaktivátory. Jedním z možných vysvětlení je vazba látky K1280 přímo na NPL, což znemožní následnou inhibici AChE. Při testování K1280 *in vitro* se sarin přidá přímo k AChE a dojde tedy nejprve k její inhibici. Následně se podá reaktivátor, čímž je zaručena možnost reaktivace enzymu. Oproti tomu *in vivo* testování je AChE inhibovaná sarinem a po 1 minutě se podává reaktivátor. V relativně stejném čase se tedy v krvi objeví enzym, sarin a testovaný reaktivátor. Může tedy dojít k reakci K1280 se sarinem. Nově vzniklá molekula se již nevejde do aktivního místa enzymu a tudíž nedojde k jeho inhibici. Protože však měříme aktivitu AChE, nejsme schopni posoudit přesný mechanismus. Pouze ho lze odvozovat ze získaných *in vitro* a *in vivo* výsledků (Soukup, Korabečný, Hepnarová, Jun, Kuča, 2017).

V realizovaných výzkumech lze často vidět úspěchy i neúspěchy použití pralidoximu při inhibici sarinem.

V mém testování *in vivo* dosáhl pralidoxim v mozku inhibovaném sarinem 0,40 %, což je nižší hodnota oproti 7,2 %, kterou dosáhl Kassa, Cabal, 2015. Rozdíl je možný z důvodu použití krysy oproti našim myším.

Testování účinnosti reaktivátorů se provádí na různých zvířatech tak, aby se potvrdila funkčnost dané látky a mohlo se přistoupit k testování na člověku. Např. na prasečím mozku, inhibovaném sarinem, se zkoumala reaktivita pralidoximu, obidoximu a HI-6. Měření prokázalo, že v mozku prasete *in vitro* vše odpovídá výsledkům, -získaných z experimentů *in vitro* i *in vivo*, při kterých byly jako experimentální zvířata použity krysy (Kuča, Cabal, Kassa, Jun, Hrabínová, 2005).

Tento fakt potvrzuje i měření, který realizoval Kassa, Cabal, 2015, kde dosáhla reaktivační hodnota v mozku 7,2 %.

Výsledky podle Kuča, Cabal, Kassa, Jun, Hrabínová, 2005 vycházely podobně, jako v mé práci. Konkrétně lze uvést, že Kuča, Cabal, Kassa, Jun, Hrabínová, 2005 naměřili účinky pralidoximu v mozku ve výši cca 10 %, což je hodnota sice nepatrně vyšší oproti mnou naměřeným 0,40 %, ale podobná jako Kassa, Cabal, 2015 s ohledem druh vybraného zvířete pro testování jsou tak výsledky téměř shodné.

Z výše uvedeného lze konstatovat, že námi stanovená metodika výzkumu byla správná, neboť výsledky vychází téměř shodně s dřívějšími poznatky. Je pravdou, že se výsledky mohou lišit s ohledem na druh vybraného zvířete (potkan, myš).

Za nová zjištění mé práce považuji to, že nekvarterní reaktivátor reaktivuje aktivitu AChE lépe než kvarterní reaktivátor pralidoxim v krvi a mozku. Tudíž se koncept nekvarterních reaktivátorů zdá být tou dobrou cestou. Samozřejmě je potřeba další optimalizaci návrhu struktury molekul za předpokladu vylepšení jejich fyzikálně-chemických vlastností a zvýšení rozpustnosti či snížení toxicity nových reaktivátorů.



## Závěr

Tato práce se zabývá měřením aktivity ChE v myší krvi, mozcích a bránicích po intoxikaci sarinem a následné aplikaci reaktivátorů (standardu a nově testovaného nekvarterního reaktivátoru). V myší krvi nebyl zjištěn výrazný rozdíl mezi zkoumanými reaktivátory a nebylo možné jednoznačně určit, který reaktivátor je účinnější. Z měření aktivity ChE v myších mozcích bylo dobře patrné, že nekvarterní reaktivátor (K1280) je účinnější než kvarterní reaktivátor (pralidoxim), protože K1280 zreaktivoval aktivitu na 11,63 %, zatímco pralidoxim pouze na 0,46%. Z měření aktivity ChE v myších bránicích vyplývá, že účinnější je naopak kvarterní reaktivátor, protože naměřená hodnota této skupiny byla podstatně vyšší.

Ze souhrnu všech zjištěných výsledků vyplývá, že nově připravená testovaná látka K1280 prokázala srovnatelné výsledky se standardním reaktivátorem – pralidoximem. Pro její úspěšnou aplikaci v praxi je však nutné ověřit domněnku, že její mechanismus není pouze reaktivace, ale vazba přímo na NPL, čímž je znemožněna následná inhibice AChE. Dle mého názoru je také zapotřebí vhodně zvolit a ještě upravit její fyzikálně-chemické vlastnosti. Současně se nedá jednoznačně určit, zda kvarterní či nekvarterní reaktivátor je účinnější při reaktivaci AChE intoxikovanou NPL.

## Seznam použitých pramenů literatury

AVDEEF, A. *Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state)*. 2001 Current topics in medicinal chemistry **1**(4): 277-351.

BAJGAR, Jiří. *Optimal choice of acetylcholinesterase reactivators for antidotal treatment of nerve agent intoxication*. 1. Hradec Králové, Orbis, 2010, 5 - 12 s. Dostupné také z: [ftp://orbis.lfhk.cuni.cz/cta\\_Medica/2010/2010\\_207.pdf](ftp://orbis.lfhk.cuni.cz/cta_Medica/2010/2010_207.pdf)

BRANDOVÁ, Daniela. *Myasthenia gravis a léčba pomocí inhibitorů acetylcholinesterázy*. *Myasthenia gravis a léčba pomocí inhibitorů acetylcholinesterázy* [online]. Pardubice, 2012, **1**(1), 16 – 17, [cit. 2017-10-15]. Dostupné z: [http://dspace.upce.cz/bitstream/handle/10195/47641/BrandovaD\\_-MyastheniaGravis\\_SS\\_2012.pdf?sequence=2](http://dspace.upce.cz/bitstream/handle/10195/47641/BrandovaD_-MyastheniaGravis_SS_2012.pdf?sequence=2)

CALAS, A.-G., J. DIAS, C. ROUSSEAU, M. ARBOLÉAS, M. TOUVREY-LOIODICE, G. MERCEY, L. JEAN, P.-Y. RENARD and F. NACHON. *An easy method for the determination of active concentrations of cholinesterase reactivators in blood samples: application to the efficacy assessment of non quaternary reactivators compared to HI-6 and pralidoxime in VX-poisoned mice*. 2017 Chemico-biological interactions **267**: 11-16.

HYRŠOVÁ, Lucie. *Stanovení plazmatické vazebnosti nově vyvíjených radiodiagnostik Alzheimerovy nemoci*. Hradec Králové, 2012. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra Farmakologie a toxikologie. Vedoucí práce Prof. PharmDr. Ing. Milan Lázníček CSc.

Inhibice enzymů. *Wikiskripta* [online]. Praha:Wikiskripta 2017 [cit. 2017-10-26]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/w/Inhibice\\_enzym%C5%AF](http://www.wikiskripta.eu/w/Inhibice_enzym%C5%AF)

JUN, Daniel, Kamil KUČA a Jiří PATOČKA. *Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body*. *Acta Medica* [online]. Hradec Králové, 2004, **1**(1), 215 – 228, [cit. 2017-10-15]. ISSN 1805-9694. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/7895418\\_Acetylcholinesterase\\_and\\_butyrylcholinesterase-important\\_enzymes\\_of\\_human\\_body](https://www.researchgate.net/publication/7895418_Acetylcholinesterase_and_butyrylcholinesterase-important_enzymes_of_human_body)

KALISIAK, Jaroslaw, Erik C. RALPH a John R. CASHMAN. *Nonquaternary Reactivators for Organophosphate-Inhibited Cholinesterases*. *Jurnal of Medicinal Chemistry*. United States, 2011, **1**(1), 1-6.

KASSA, J. a J. CABAL. *A comparison of the efficacy of a new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with presently used oximes and H oximes against sarin by in vitro and in vivo methods*. *Human & Experimental Toxicology*. Hradec Králové, 2015, **1**(1.), 560 – 563

KASSA, J., J. MISÍK a J. Z. KARASOVÁ. *A comparison of the potency of a novel bispyridinium oxime K203 and currently available oximes (obidoxime, HI-6) to counteract the acute neurotoxicity of sarin in rats*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22536919> [online]. 2012, **1**(1.), 2-4 [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1111/j.1742-7843. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22536919>

KASSA, J., V. ŠEPSOVÁ, A. HOROVÁ a K. MUSÍLEK. *A comparison of the reactivating and therapeutic efficacy of two novel bispyridinium oximes (K727, K733) with the oxime HI-6 and obidoxime in sarin-poisoned rats and mice*. *Toxicology Mechanisms and Methods* [online]. 2015, **25**(1.), 229-233 [cit. 2018-01-20]. Dostupné

z:<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/15376516.2015.1036333?journalCode=itxm20>

KASSA, Jiří, Jana ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, Vendula ŠEPSOVÁ a Filip CAISBERGER. *The Benefit of Combinations of Oximes for the Reactivating and Therapeutic Efficacy of Antidotal Treatment of Sarin Poisoning in Rats and Mice*. BCPT - Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology [online]. Hradec Králové, 2011, 22. února 2011, **1**(1), 30-34 [cit. 2018-01-14]. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00678.x. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-7843.2011.00678.x/full>

KLIACHYNA, M., G. SANTONI, V. NUSSBAUM, J. RENOU, B. SANSON, J.-P. COLLETIER, M. ARBOLÉAS, M. LOIODICE, M. WEIK AND L. JEAN. *Design, synthesis and biological evaluation of novel tetrahydroacridine pyridine-aldoxime and-amidoxime hybrids as efficient uncharged reactivators of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase*. 2014. European journal of medicinal chemistry **78**: 455-467.

KOVAŘÍK Z., VRDOLJAK A., BEREND S., KATALINIC M., KUČA K., MUSÍLEK K., RADIĆ B. (2009) *Evaluation of oxime K203 as antidote in tabun poisoning*. Arh Hig. Rad. Toksikol. Vol. 60, s. 19-26

KUČA, K., J. CABAL a J. KASSA. *A comparison of the potency of newly developed oximes (K005, K027, K033, K048) and currently used oximes (pralidoxime, obidoxime, HI-6) to reactivate sarin-inhibited rat brain acetylcholinesterase by in vitro methods*. J Toxicol Environ Health A. [online]. 2005, **1**(1.), 677-686 [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1080/15287390590921784. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med/15901095>

KUČA, K., J. CABAL a J. KASSA. *In vitro reactivation of sarin-inhibited brain acetylcholinesterase from different species by various oximes*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. Hradec Králové, 2004, **1**(1.), 1-5. DOI: K. KUCĀ A, J. CABAL, & J. KASSA.

KUČA, Kamil a Daniel JUN. *Koncept nekvarterních reaktivátorů AChE jakožto antidot otrav organofosfáty - nová naděje či slepá cesta?* [online]. Hradec Králové, 2017 [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <http://devel.rvvi.cz/cep?s=jednoduche-vyhledavani&ss=detail&n=0&h=GA15-16701S>. Standartní projekty. Ministerstvo obrany / Univerzita obrany - Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové.

KUČA, Kamil, Jiří CABAL, Jiří KASSA, Daniel JUN a Martina HRABINOVÁ. *Comparison of in vitro potency of oximes (pralidoxime, obidoxime, HI-6) to reactivate sarin-inhibited acetylcholinesterase in various parts of pig brain*. Journal of applied toxicology. Hradec Králové, 2005, **1**(1.), 271 - 275.

MERCEY, G., J. RENOU, T. VERDELET, M. KLIACHYNA, R. BAATI, E. GILLON, M. L. ARBOLÉAS, M. L. LOIODICE, F. NACHON AND L. JEAN. *Phenyltetrahydroisoquinoline-pyridinaldoxime conjugates as efficient uncharged reactivators for the dephosphylation of inhibited human acetylcholinesterase*. 2012. Journal of medicinal chemistry **55**(23): 10791-10795.

MERCEY, G., T. VERDELET, G. SAINT-ANDRÉ, E. GILLON, A. WAGNER, R. BAATI, L. JEAN, F. NACHON AND P.-Y. RENARD. *First efficient uncharged reactivators for the dephosphylation of poisoned human acetylcholinesterase*. 2011. Chemical Communications **47**(18): 5295-5297.

MUSÍLEK, Kamil. *Mikrovlánná příprava reaktivátorů cholinesteras*. Hradec Králové, 2017. Specifický výzkum v rámci magisterského studia. Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové.

PAAR, Martin. *Studium vztahů mezi strukturou a afinitou k acetylcholinesteráze u vybraných pyridiniových derivátů*. Hradec Králové, 2006. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv.

PICCIOTTO, Maria R., Meenaksi ALREJA a J. David JENTSCH. *Acetylcholine*. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. American College of Neuropsychopharmacology, 2002, **1**(1.), 12.

POHANKA, Miroslav. *Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Meet Immunity*. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **1**(1.), 1-7 [cit. 2017-12-26]. DOI: :10.3390/ijms15069809. Dostupné z: <http://images.biomedsearch.com/24893223/ijms-15-09809.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIBOKHYOLP4MBMRGQ&Expires=1514419200&Signature=4Rpz3HUfKTE1ERjKsB2N%2FnxcpDg%3D>

RENOU, J., G. MERCEY, T. VERDELET, E. PĂUNESCU, E. GILLON, M. ARBOLÉAS, M. LOIODICE, M. KLIACHYNA, R. BAATI AND F. NACHON. *Syntheses and in vitro evaluations of uncharged reactivators for human acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents*. 2013. *Chemico-biological interactions* **203**(1): 81-84.

RENOU, J., M. LOIODICE, M. ARBOLÉAS, R. BAATI, L. JEAN, F. NACHON and P.-Y. RENARD. *Tryptoline-3-hydroxypyridinaldoxime conjugates as efficient reactivators of phosphorylated human acetyl and butyrylcholinesterases*. 2014. *Chemical Communications* **50**(30): 3947-3950.

SAKURADA, K., K. MATSUBARA, K. SHIMIZU, H. SHIONO, Y. SETO, K. TSUGE, M. YOSHINO, I. SAKAI, H. MUKOYAMA AND T. TAKATORI. *Pralidoxime iodide (2-PAM) penetrates across the blood-brain barrier*. 2003. *Neurochemical Research* **28**(9): 1401-1407.

SOUKUP Ondřej, KORABEČNÝ Jan, HEPNAROVÁ Vendula, JUN Daniel, KUČA Kamil a kol. *An in vitro evaluation of non-quaternary reactivators of AChE as antidotes of organophosphorus poisoning - a new hope or a blind way?*. Hradec Králové, 2017.

ŠVELA K., ŠEVČÍK P, KRAUS R. a kol. (2002) *Akutní intoxikace v intenzivní medicíně*. Grada Publishing Praha, s. 248.

## Seznam zdrojů obrázků

### Obrázek 1: Acetylcholin

Acetylcholine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-10-15]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholine>

### Obrázek 2: Synapse

MAREK, Viktor. Synapse. In: *Slydeplayer* [online]. online: slideplayer, 2017 [cit. 2017-10-24]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/5617663/>

### Obrázek 3: Acetylcholinesterasa

Schematic representation of AChE binding sites. In: *US National Library of Medicine National Institutes of Health* [online]. Serbia: Bentham Science Publishers, 2013 [cit. 2017-12-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648782/figure/F2/>

### Obrázek 4: Srovnání mozku zdravého člověka s mozkem člověka postiženého AD

HYRŠOVÁ, Lucie. *Stanovení plazmatické vazebnosti nově vyvíjených radiodiagnostik Alzheimerovy nemoci*. Hradec Králové, 2012. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra Farmakologie a toxikologie. Vedoucí práce Prof. PharmDr. Ing. Milan Lázníček CSc.

### Obrázek 5: Takrin

Tacrine. In: *Wikimedia commons* [online]. San Francisco: Wikimedia commons, 2008 [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tacrine.svg>

### Obrázek 6: Rivastigmin

Rivastigmin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-10-15]. Dostupné z: <http://www.wikiwand.com/de/Rivastigmin>

### Obrázek 7: Donepezil

Donepezil. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-10-15]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Donepezil-Enantiomers\\_V\\_1.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Donepezil-Enantiomers_V_1.png)

### Obrázek 8: Galantamin

Galantamin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-10-15]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Galantamine\\_Enantiomers\\_V\\_1.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Galantamine_Enantiomers_V_1.png)

### Obrázek 9: Reakce AChE s karbamáty

JUN, Daniel, Kamil KUČA a Jiří PATOČKA. *Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body*. Acta Medica [online]. Hradec Králové, 2004, 1(1), 215 – 228, [cit. 2017-10-15]. ISSN 1805-9694. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/7895418\\_Acetylcholinesterase\\_and\\_butyrylcholinesterase-important\\_enzymes\\_of\\_human\\_body](https://www.researchgate.net/publication/7895418_Acetylcholinesterase_and_butyrylcholinesterase-important_enzymes_of_human_body)

### Obrázek 10: Reakce AChE s organofosfáty

JUN, Daniel, Kamil KUČA a Jiří PATOČKA. *Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body*. Acta Medica [online]. Hradec Králové, 2004, 1(1), 215 – 228, [cit. 2017-10-15]. ISSN 1805-9694. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/7895418\\_Acetylcholinesterase\\_and\\_butyrylcholinesterase-important\\_enzymes\\_of\\_human\\_body](https://www.researchgate.net/publication/7895418_Acetylcholinesterase_and_butyrylcholinesterase-important_enzymes_of_human_body)

**Obrázek 11: Chemická struktura známých NPL**

PAAR, Martin. *Studium vztahů mezi strukturou a afinitou k acetylcholinesteráze u vybraných pyridiniových derivátů*. Hradec Králové, 2006. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv.

**Obrázek 12: Akompetitivní inhibice**

Uncompetitive inhibition. In: *Introduction to Practical Biochemistry* [online]. Hungary: elte.prompt, 2013 [cit. 2018-01-22]. Dostupné z: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/-IntroductionToPracticalBiochemistry/ch09s04.html>

**Obrázek 13: Chemické struktury kvarterních reaktivátorů**

SOUKUP Ondřej, KORABEČNÝ Jan, HEPNAROVÁ Vendula, JUN Daniel, KUČA Kamil a kol. *An in vitro evaluation of non-quaternary reactivators of AChE as antidotes of organophosphorus poisoning - a new hope or a blind way?*. Hradec Králové, 2017.

**Obrázek 14: Chemické struktury vybraných nekvarterních reaktivátorů**

SOUKUP Ondřej, KORABEČNÝ Jan, HEPNAROVÁ Vendula, JUN Daniel, KUČA Kamil a kol. *An in vitro evaluation of non-quaternary reactivators of AChE as antidotes of organophosphorus poisoning - a new hope or a blind way?*. Hradec Králové, 2017.

**Obrázek 15: Odebraná myší krev v eppendorfce**

Fotografie pořízená autorkou v roce 2017

**Obrázek 16: Měření aktivity AChE v krvi**

Fotografie pořízená autorkou v roce 2017

**Obrázek 17 Myší mozky**

Fotografie pořízená autorkou v roce 2017

**Obrázek 18: Zhomogenizované mozky**

Fotografie pořízená autorkou v roce 2017

**Obrázek 19: Myší bránice**

Fotografie pořízená autorkou v roce 2017

**Obrázek 20: Koncentrační řada cysteinu**

Fotografie pořízená autorkou v roce 2017

## Seznam použitých obrázků

Obrázek 1 Acetylcholin.....	10
Obrázek 2 Synapse .....	11
Obrázek 3 Acetylcholinesterasa .....	12
Obrázek 4 Srovnání mozku zdravého člověka s mozkiem člověka postiženého AD ...	15
Obrázek 5 Takrin.....	15
Obrázek 6 Rivastigmin.....	16
Obrázek 7 Donepezil.....	16
Obrázek 8 Galantamin.....	17
Obrázek 9 Reakce AChE s karbamáty .....	17
Obrázek 10 Reakce AChE s organofosfáty.....	18
Obrázek 11 Chemická struktura známých NPL .....	18
Obrázek 12 Akompetitivní inhibice .....	19
Obrázek 13 Chemické struktury kvarterních reaktivátorů .....	21
Obrázek 14 Chemické struktury vybraných nekvarterních reaktivátorů.....	23
Obrázek 15 Odebraná myší krev v eppendorfce .....	28
Obrázek 16 Měření aktivity AChE v krvi .....	29
Obrázek 17 Myší mozky .....	30
Obrázek 18 Zhomogenizované mozky.....	31
Obrázek 19 Myší bránice .....	32
Obrázek 20 Koncentrační řada cysteinu.....	33
Obrázek 21 Eppendorfký .....	53
Obrázek 22 Homogenizér.....	54
Obrázek 23 Kádinka 100 ml.....	55
Obrázek 24 Kyveta.....	56
Obrázek 25 Spektrofotometr .....	57
Obrázek 26 Váha.....	58

## **Seznam zdrojů tabulek**

### **Tabulka 1: Skupiny měření**

Tabulka vytvořená autorkou v roce 2017



## **Seznam použitých tabulek**

Tabulka 1 Skupiny měření .....	27
--------------------------------	----

## Seznam zdrojů grafů

**Graf 1: Aktivita AChE v krvích**

Graf vytvořený autorkou v roce 2017

**Graf 2: Aktivita AChE v mozcích**

Graf vytvořený autorkou v roce 2017

**Graf 3: Aktivita AChE v bránicích**

Graf vytvořený autorkou v roce 2017

## Seznam použitých grafů

Graf 1 Aktivita AChE v krvích .....	35
Graf 2 Aktivita AChE v mozcích.....	36
Graf 3 Aktivita AChE v bránicích.....	37

## **Přílohy**

**Příloha A** Přehled použitých pomůcek

**Příloha B** Tabulka z měření aktivity ChE v krvi

**Příloha C** Tabulka z měření aktivity ChE v mozku

**Příloha D** Tabulka z měření ChE v bránici

## Příloha A Přehled použitých pomůcek

- **Eppendorfký**

Tabulka 2 Údaje o eppendorfkách, (autorka, 2017)

Značka:	Eppendorf
Země původu:	Česká republika
Objem:	1,5 ml

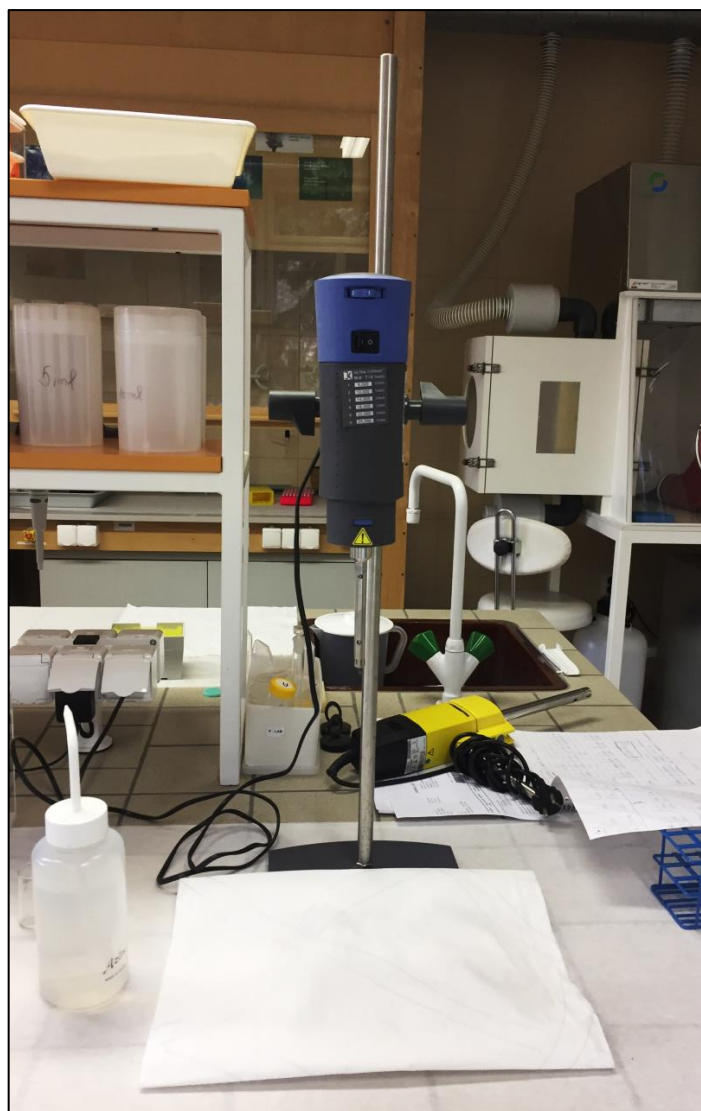


Obrázek 21 Eppendorfký, (autorka, 2017)

- **Homogenizér**

Tabulka 3 Údaje o homogenizéru, (autorka, 2017)

Značka:	Turrax T18, IKA
Země původu:	USA
Rychlost:	6 000 – 24 000 RPM
Výkon:	300 W
El. napětí:	230 V
Frekvence:	50/60 Hz



Obrázek 22 Homogenizér, (autorka, 2017)

- **Kádinky**

Tabulka 4 Údaje o kádinkách, (autorka, 2017)

Značka:	Pyrex
Země původu:	Česká republika
Objem:	100 ml



Obrázek 23 Kádinka 100 ml, (autorka, 2017)

- **Kalkulačka**

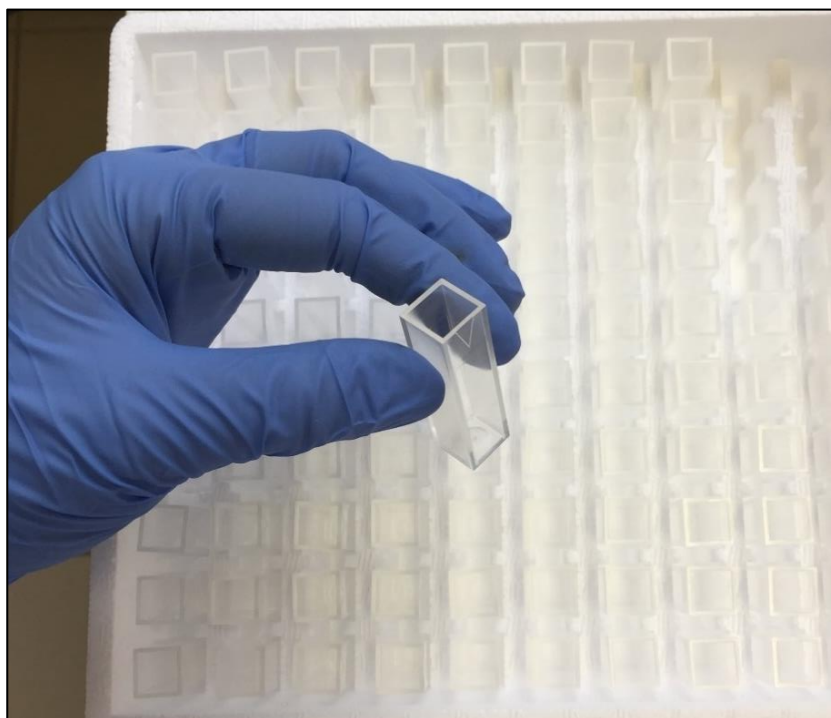
Tabulka 5 Údaje o kalkulačce, (autorka, 2017)

Značka:	Casio
Země původu:	Čína

- **Kyvety**

Tabulka 6 Údaje o kyvetách, (autorka, 2017)

Značka:	Plastibrand
Země původu:	Německo
Objem:	2,5ml
Rozměry:	12,5 x 12,5 x 45 mm



Obrázek 24 Kyveta, (autorka, 2017)

- Špachtle
- Parafilm
- Petriho miska
- pH metr
- Pipety + příslušné špičky

Tabulka 7 Údaje o pipetách a příslušných špičkách, (autorka, 2017)

Značka:	Brand
Země původu:	Česká republika

- Rukavice
- Spektrofotometr

Tabulka 8 Údaje o spektrofotometru, (autorka, 2017)

Značka:	Thermo Scientifict, Hexios $\alpha$
Země původu:	Velká Británie





Obrázek 25 Spektrofotometr, (autorka, 2017)

- **Váha**

Tabulka 9 Údaje o váze, (autorka, 2017)

Značka:	Mettler Toledo
Země původu:	Česká republika



Obrázek 26 Váha, (autorka, 2017)

- Zkumavky

Příloha B Tabulka z měření aktivity ChE v krvi

Tabulka 10 Měření ChE v krvi, (autorka, 2017)

skupina. vzorek		aktivita	kalibrace	ředění	U/L	ukavL	umol/min/ml	ukat/ml	
<b>PLNÁ KREV:</b>									
K1	0,03250	0,232915	20	2791	46,51	2,79	Mean	46,27	0,033
K2	0,03250	0,232915	20	2791	46,51	2,79	Std. Deviation	4,064	0,034
K3	0,03500	0,232915	20	3005	50,09	3,01	Std. Error	1,659	0,036
K4	0,03250	0,232915	20	2791	46,51	2,79	Lower 95% CI of mea	42,01	0,033
K5	0,02700	0,232915	20	2318	38,64	2,32	Upper 95% CI of mea	50,54	0,027
K6	0,03450	0,232915	20	2962	49,37	2,96			0,035
K7			20	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			0,034
K8			20	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
1,1	0,00200	0,232915	20	172	2,86	0,17	Mean	4,1730	0,002
1,2	0,00350	0,232915	20	301	5,01	0,30	Std. Deviation	1,3890	0,003
1,3	0,00300	0,232915	20	258	4,29	0,26	Std. Error	0,5672	0,003
1,4	0,00450	0,232915	20	386	6,44	0,39	Lower 95% CI of mea	2,7150	0,005
1,5	0,00250	0,232915	20	215	3,58	0,21	Upper 95% CI of mea	5,6310	0,003
1,6	0,00200	0,232915	20	172	2,86	0,17			0,002
1,7			20	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			0,002
1,8			20	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
2,1	0,01800	0,27718	20	1299	21,65	1,30	Mean	18,8400	0,018
2,2	0,01200	0,27718	20	866	14,43	0,87	Std. Deviation	3,4180	0,012
2,3	0,01250	0,27718	20	902	15,03	0,90	Std. Error	1,3950	0,013
2,4	0,01750	0,27718	20	1263	21,05	1,28	Lower 95% CI of mea	15,2500	0,017
2,5	0,01550	0,27718	20	1118	18,64	1,12	Upper 95% CI of mea	22,4300	0,016
2,6	0,01850	0,27718	20	1335	22,25	1,33			0,019
2,7			20	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			0,018
2,8			20	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
3,1	0,01350	0,27718	20	974	16,24	0,97	Mean	20,4500	0,014
3,2	0,01600	0,27718	20	1155	19,24	1,15	Std. Deviation	2,7670	0,017
3,3	0,01800	0,27718	20	1299	21,65	1,30	Std. Error	1,1290	0,018
3,4	0,01700	0,27718	20	1227	20,45	1,23	Lower 95% CI of mea	17,5400	0,017
3,5	0,02050	0,27718	20	1479	24,65	1,48	Upper 95% CI of mea	23,3500	0,022
3,6	0,01700	0,27718	20	1227	20,45	1,23			0,017
3,7			20	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			0,017
3,8			20	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			

Příloha C Tabulka z měření aktivity ChE v mozku

Tabulka 11 Měření aktivity ChE v mozku, (autorka, 2017)

MOZEK - ACHE:									
skupina, vzorek	aktivita	kalibrace	ředění	U/L	ukávl	umol/min/ml	ukat/mg		
K1	0,24850	0,233415	10	10648	177,44	10,85	173,7	0,248	0,249
K2	0,25200	0,233415	10	10798	179,94	10,80	4,521	0,247	0,257
K3	0,24350	0,233415	10	10432	173,87	10,43	1,848	0,246	0,241
K4	0,23800	0,233415	10	10198	169,94	10,20		0,241	0,235
K5	0,23500	0,233415	10	10068	167,80	10,07	168,9	0,231	0,239
K6	0,24250	0,233415	10	10389	173,15	10,39	178,4	0,242	0,243
K7	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
K	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
1,1	0,02800	0,27716	10	1010	16,84	1,01	27,3100	0,028	0,028
1,2	0,07900	0,27716	10	2850	47,51	2,85	12,1300	0,079	0,079
1,3	0,05700	0,27716	10	2057	34,28	2,06	4,9500	0,058	0,058
1,4	0,04650	0,27716	10	1678	27,96	1,68		0,046	0,047
1,5	0,03600	0,27716	10	1299	21,65	1,30	14,5900	0,035	0,037
1,6	0,02600	0,27716	10	938	15,63	0,94	40,0400	0,027	0,025
1,7	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
1,8	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
2,1	0,05850	0,27716	10	2111	35,18	2,11	25,8600	0,059	0,058
2,2	0,02800	0,27716	10	1010	16,84	1,01	8,6670	0,028	0,028
2,3	0,03000	0,27716	10	1082	18,04	1,08	3,5380	0,03	0,03
2,4	0,04800	0,27716	10	1732	28,86	1,73		0,047	0,049
2,5	0,03350	0,27716	10	1209	20,14	1,21	16,7600	0,033	0,034
2,6	0,06000	0,27716	10	2165	36,08	2,16	34,9500	0,063	0,057
2,7	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
2,8	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
3,1	0,09500	0,320135	10	2967	49,46	2,97	45,0400	0,094	0,096
3,2	0,07650	0,320135	10	2390	39,83	2,39	7,5170	0,076	0,077
3,3	0,10950	0,320135	10	3420	57,01	3,42	3,0690	0,11	0,109
3,4	0,07400	0,320135	10	2312	38,53	2,31		0,073	0,075
3,5	0,09050	0,320135	10	2827	47,12	2,83	37,1500	0,091	0,09
3,6	0,07350	0,320135	10	2296	38,27	2,30	52,9200	0,073	0,074
3,7	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
3,8	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			

Příloha D Tabulka z měření aktivity ChE v bránici

Tabulka 12 Měření aktivity ChE v bránici, (autorka, 2017)

BRÁNICE:											
skupina, vzorek	aktivita	kalibrace	ředění	U/L	ukav/L	umol/min/ml	ukav/mg				
K1	0,03150	0,34448	10	914	15,24	0,91	15,44	0,03	0,033		
K2	0,02900	0,34448	10	842	14,03	0,84	0,9726	0,028	0,03		
K3	0,03350	0,34448	10	973	16,21	0,97	0,3971	0,037	0,03		
K4	0,03250	0,34448	10	944	15,73	0,94		0,038	0,027		
K5	0,03050	0,34448	10	885	14,76	0,89	14,42	0,031	0,03		
K6	0,03450	0,34448	10	1002	16,69	1,00	16,46	0,037	0,032		
K7	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
K	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
1,1	0,01300	0,33812	10	384	6,41	0,38	6,2450	0,011	0,015		
1,2	0,01800	0,33812	10	532	8,87	0,53	1,9620	0,016	0,02		
1,3	0,01450	0,33812	10	429	7,15	0,43	0,8012	0,013	0,016		
1,4	0,01450	0,33812	10	429	7,15	0,43		0,014	0,015		
1,5	0,00850	0,33812	10	251	4,19	0,25	4,1980	0,007	0,01		
1,6	0,00750	0,33812	10	222	3,70	0,22	8,3040	0,008	0,007		
1,7	#DIV/0!	0,33812	10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
1,8	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
2,1	0,03450	0,30965	10	1114	18,57	1,11	13,5000	0,033	0,036		
2,2	0,02650	0,30965	10	856	14,26	0,89	3,4700	0,029	0,024		
2,3	0,02350	0,30965	10	759	12,65	0,76	1,4170	0,027	0,02		
2,4	0,02300	0,30965	10	743	12,38	0,74		0,023	0,023		
2,5	0,01500	0,30965	10	484	8,07	0,48	9,8580	0,014	0,016		
2,6	0,02800	0,30965	10	904	15,07	0,90	17,1400	0,03	0,026		
2,7	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
2,8	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
3,1	0,02600	0,31474	10	826	13,77	0,83	8,6500	0,027	0,025		
3,2	0,01700	0,31474	10	540	9,00	0,54	2,8750	0,016	0,018		
3,3	0,01750	0,31474	10	556	9,27	0,56	1,1740	0,02	0,015		
3,4	0,01050	0,31474	10	334	5,56	0,33		0,008	0,013		
3,5	0,01450	0,31474	10	461	7,68	0,46	5,6330	0,014	0,015		
3,6	0,01250	0,31474	10	397	6,62	0,40	11,6700	0,015	0,01		
3,7	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
3,8	#DIV/0!		10	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					