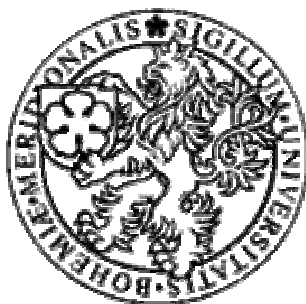


JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
Zdravotně sociální fakulta  
České Budějovice

---



**Diplomová práce**

**Stanovení oximů v biologických materiálech metodou HPLC**

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Jana Žďárová Karasová.  
Autor: Petr Procházka

České Budějovice

---

2008

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Petr Procházka

V Českých Budějovicích 26. května 2008

Děkuji vedoucímu diplomové práce PharmDr. Janě Žďárové Karasové za pomoc a vedení při zpracování bakalářské práce a umožnění vzniku této práce. Touto cestou bych rád poděkoval také Mgr. Petru Stodůlkovi za odbornou pomoc při provádění praktických stanovení. Také bych rád poděkoval Prof. RNDr. Jiřímu Patočkovi, DrSc. a Melitě Kosanović, PhD. za cenné rady a konzultace.

## ABSTRAKT

Reaktivátory acetylcholinesterázy hrají významnou v terapii otrav způsobené organofosfáty. V současné době je testována celá řada z hlediska schopnosti prostupovat přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Cílem této práce bylo otestovat tuto schopnost u čtyřech známých reaktivátorů – HI-6, K-027, K-074 a TO-032. Dávka 5%LD<sub>50</sub> (terapeutická dávka) každého reaktivátoru byla aplikována experimentálním zvířatům (potkan Wistar rat) i.m. do pravého zadního stehna. Poté byla zvířata obětována a byl odebrán mozek a krev (plasma) pro HPLC analýzy. Mozek byl následně zmražen na -80 °C až do doby před samotnou analýzou. Koncentrace reaktivátorů byly měřeny v plasmě a čtyřech částech mozku – frontální kůře (FC), bazálních gangliích (BG), pontomedulární oblasti (PM) a mozečku (Ce). Pro účely experimentu bylo do jednotlivých skupin zařazeno pět zvířat. Ke stanovení koncentrací reaktivátorů v plasmě a mozku byla použita metodika HPLC-UV/VIS.

Koncentrace HI-6 C<sub>FC</sub> byla vypočítána na 4,29% vzhledem k C<sub>prům.</sub> v plasmě, C<sub>BG</sub> byla průměrně 1,9% vzhledem k C<sub>prům.</sub> v plasmě, C<sub>PM</sub> byla průměrně 2,3% vzhledem k C<sub>prům.</sub> v plasmě a C<sub>Ce</sub> byla průměrně 1,85% vzhledem k C<sub>prům.</sub> v plasmě. Tyto poměry byly vypočteny ze všech zjištěných koncentrací v rámci jednotlivých sledovaných částí mozku. Ostatní sledované reaktivátory nebyly v mozku kvantifikovány vůbec.

## ABSTRACT

Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphate inhibitors play an important role in organophosphate poisoning therapy. There are a large number of reactivators being tested for their ability of penetration through blood-brain barrier (BBB) nowadays. The main aim of this thesis is to test this ability in four well know reactivators – HI-6, K-027, K-074 and TO-032. The 5% lethal dose (LD<sub>50</sub>) – therapeutic dose - of each reactivator was *i.m.* (intramuscularly) applied to experimental animals (Wistar rats) into right posterior thighs. Then the animals were sacrificed and the blood

(plasma) and brain were collected for HPLC analysis. Subsequently, brain and plasma were frozen at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and stored until the assay. The reactivator concentrations were measured in plasma and four parts of the brain – frontal cortex (FC), basal ganglia (BG), ponto-medullar part (PM) and cerebellum (Ce). There were five animals for each group used for the purpose of the experiment. The concentrations of reactivators in plasma and blood samples were measured using HPLC-UV/VIS methodology.

HI-6 concentrations  $C_{\text{FC}}$  were on the average 4.29% of  $C_{\text{average}}$  in plasma,  $C_{\text{BG}}$  were on the average 1.9% of  $C_{\text{average}}$  in plasma,  $C_{\text{PM}}$  were on the average 2.3% of  $C_{\text{average}}$  in plasma, and  $C_{\text{Ce}}$  were on the average 1.85% of  $C_{\text{average}}$  in plasma. These rates were counted from all concentrations within the scope of particular observed parts of the brain. All the other tested reactivators were not quantified in brain at all.

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2. SOUČASNÝ STAV.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Systém a funkce cholinesteráz .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Hematoencefalická bariéra (HEB) .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Organofosforové inhibitory cholinesteráz (OFI) .....</b>	<b>14</b>
2.3.1 Organofosforové pesticidy a průmyslové látky .....	15
2.3.2 Nervově paralytické látky .....	18
2.3.3 Toxikokinetika NPL.....	21
2.3.4 Toxikodynamika NPL.....	22
<b>2.4 Současné trendy v profylaxi a terapii intoxikace OFI.....</b>	<b>23</b>
2.4.1 Terapie .....	23
2.4.2 Profylaxe .....	26
2.4.3 Reaktivátory AChE – oximy.....	27
<b>2.5 Teoretické základy vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).....</b>	<b>32</b>
2.5.1 Základní uspořádání HPLC.....	32
2.5.2 Separační modely .....	34
2.5.3 Modifikace separačního modelu „partition“ – reverzní chromatografie s použitím silikagelu, jako stacionární fáze .....	38
2.5.4 Možnosti detekce v HPLC .....	40
<b>3. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Cíl práce.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Hypotéza .....</b>	<b>43</b>
<b>4. METODIKA.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Experimentální model .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 Příprava vzorků .....</b>	<b>45</b>
4.2.1 Příprava plasmy po aplikaci reaktivátoru .....	45
4.2.2 Příprava mozku po aplikaci reaktivátoru .....	48
<b>4.3 Podmínky analýzy .....</b>	<b>51</b>

<b>4.4 Kalibrační křivky</b> .....	<b>52</b>
4.4.1 Příprava vzorků pro kalibraci – plasmy .....	52
KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO PLASMY – HI-6.....	52
KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO PLASMY – K-027 .....	53
KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO PLASMY – K-074 .....	54
KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO PLASMY – TO-032.....	55
4.4.2 Příprava vzorků pro kalibraci – mozek .....	55
<b>4.5 Základní metody statistického zpracování</b> .....	<b>56</b>
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>57</b>
<b>5.1 Výsledky stanovení HI-6</b> .....	<b>57</b>
5.1.1 Výsledky stanovení HI-6 v plasmě .....	57
5.1.2 Výsledky stanovení HI-6 v mozku .....	58
5.1.3 Shrnutí výsledků stanovení HI-6 v plasmě a mozku .....	68
<b>5.2 Výsledky stanovení K-027</b> .....	<b>69</b>
5.2.1 Výsledky stanovení K-027 v plasmě .....	69
<b>5.3 Výsledky stanovení K-074</b> .....	<b>70</b>
5.3.1 Výsledky stanovené K-074 v plasmě.....	70
<b>5.4 Výsledky stanovení TO-032</b> .....	<b>72</b>
5.4.1 Výsledky stanovení TO-032 v plasmě .....	72
<b>6. DISKUZE</b> .....	<b>75</b>
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>78</b>
<b>8. LITERATURA</b> .....	<b>79</b>
<b>9. KLÍČOVÁ SLOVA</b> .....	<b>88</b>
<b>10. PŘÍLOHY</b> .....	<b>89</b>

# 1. ÚVOD

V současnosti existuje celá řada chemických látek, které mohou být zneužity jako bojové chemické ve válečných konfliktech teroristickými skupinami. Jednou skupinou takovýchto látek jsou organofosforové inhibitory acetylcholinesterázy (OFI), za nejtoxičtější zástupce jsou uznávány nervově paralytické látky (NPL), jako jsou např. sarin, soman a tabun. Využití OFI není pouze jako bojové chemické látky (BCHL), ale průmyslově se vyrábějí a mají široké použití například v zemědělství jako pesticidy. Patří mezi ně často užívané látky jako paraoxon, parathion, chlorpyrifos apod. Tyto látky relativně snadno dostupné, může tedy dojít k náhodné otravě nesprávným zacházením na základě neznalosti, ale jsou také popsány případy požití při sebevraždách. Pokud dojde k otravě OFI, je nutné okamžitě zahájit terapii. Ta také zahrnuje použití tzv. reaktivátorů cholinesteráz, jako je pralidoxim (2-PAM), obidoxim, trimedoxim, methoxim, K-027 apod. Terapie, tak jak ji známe dnes není stále dostačující. Je tedy nutné vyvíjet stále nové a efektivnější reaktivátory, které by byly schopné lépe reaktivovat inhibovaný enzym.

Jedním ze současných trendů výzkumu v oblasti reaktivátorů je jejich testování průchodu přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Bohužel je jen velmi málo pracovišť, která tyto výzkumy provádějí a pokud ano, tak se soustředí každé na jinou oblast nebo specifiku daného problému. Tyto pracoviště jsou Katedra toxikologie a Centrum pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Tato pracoviště se soustředí zejména na syntézu nových reaktivátorů a testování jejich účinnosti in vitro a in vivo, neuroprotektivními účinky a pozorováním těchto látek na úrovni celého organismu. Dalším pracovištěm je Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine and Health Science, UAE University v Al Ain ve Spojených arabských emirátech, které se zabývá reaktivací cholinesterázy inhibované pesticidy. A třetím nejdůležitějším pracovištěm je National Research Institute of Police Science v Japonsku, jenž se zaměřuje zejména na



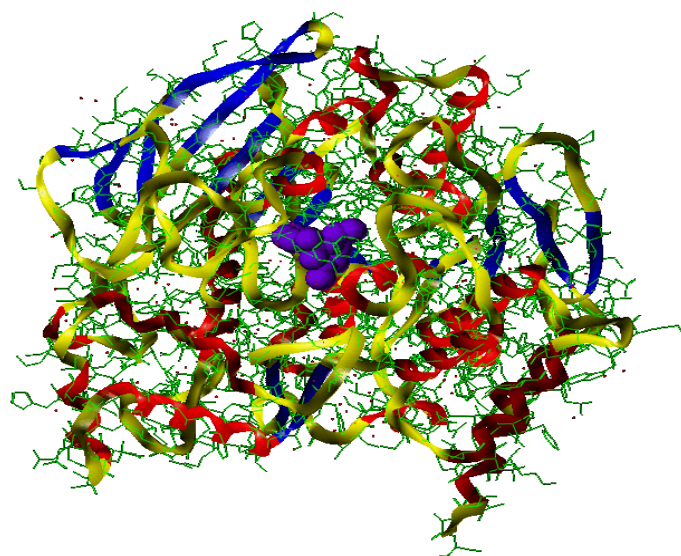
reaktivátory typu pralidoximu. Všechny pracoviště provádějí analýzy reaktivátorů ve vzorcích mozků. Z výčtu pracovišť je zřejmé, že není příliš mnoho možností výsledky konzultovat.

V této práci je uvedena analýza vybraných reaktivátorů – HI-6, TO-032, K-027 a K-074 ve vzorcích plasmy a mozků laboratorních potkanů. Dále poskytuje náhled na distribuci reaktivátorů v rámci různých částí mozku. Také porovnává zjištěné koncentrace reaktivátorů s jejich koncentracemi v plasmě.

## 2. SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Systém a funkce cholinesteráz

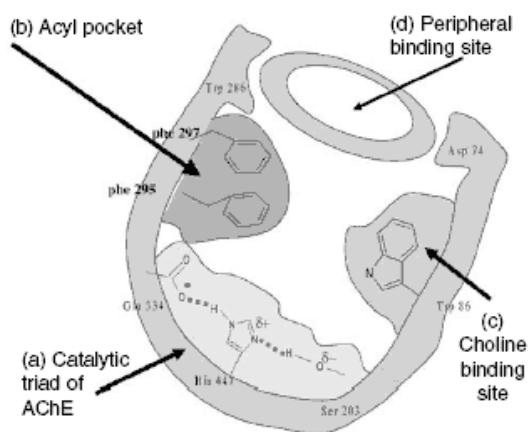
Cholinesterázy jsou skupina enzymů katalyzující v organismu hydrolyzu acetylcholinu (ACh). Do této skupiny se řadí strukturně a funkčně velmi podobné enzymy acetylcholinesteráza (AChE) (Obr.1) a butyrylcholinesteráza (BuChE) (39). Oba tyto enzymy katalyzují hydrolyzu ACh. Čím se však liší, je jejich schopnost hydrolyzovat jiné substráty, jako jsou estery karboxylových kyselin s objemnějším azylovým zbytkem (butyrylcholin, benzoylcholin) (39). Objemnější substráty jsou lépe hydrolyzovatelné pomocí BuChE (např. pambuterol nebo ethopropazin) (62). Také tkáňová distribuce u obratlovců se u obou enzymů liší. AChE se primárně nachází v centrální nervové soustavě (CNS), nervových zakončeních a na povrchu erytrocytů. Zde hraje zásadní úlohu při přenosu nervového vzruchu. BuChE se pak nachází v játrech, krevním séru nebo ledvinách. Její konkrétní úloha není zcela jasná. S největší pravděpodobností hydrolyzuje estery, které vznikají během metabolismu (12). Stejně jako AChE, také BuChE se nevyskytuje pouze u obratlovců, ale také bezobratlých živočichů. U obratlovců jsou oba enzymy kódovány jedním genem, zatímco u bezobratlých až čtyřmi geny (12,15). Cholinesteratickou aktivitu vykazují také některé druhy rostlin a řas (13, 14, 73).



**Obr 1.** Model AChE inhibované huperzinem A (© Department of Computational Science, National University of Singapore – <http://bidd.nus.edu.sg/group/research.htm>).

Mezi AChE a BuChE existují mezidruhové rozdíly, a to hlavně v aminokyselinovém složení (39). Struktury aktivních míst, které jsou důležité pro katalytickou funkci obou enzymů, se však liší jen velmi málo. Aktivní místo se u obou enzymů nachází ve 20 Å (2 nm) hluboké kavitě globulární katalytické podjednotky. V aktivním místě je také uložena tzv. „katalytická triáda“ (Obr 2), kterou tvoří tři aminokyselinové zbytky podílející se na vlastní enzymové reakci (Ser200, His440 a Glu327) (67). Stabilizace substrátu v aktivním místě se účastní i další části katalytické podjednotky. Karbonylový kyslík Ach během hydrolýzy stabilizuje tzv. anionické místo (Gly118, Gly119 a Ala201) (18). Také aminokyselinový fragment (Ser91-Glu92-Asp93-Cys94-Leu95) má významný podíl na katalytické reakci, jeho funkce však není doposud zcela známá (12). Dvě anionická rezidua (Glu92 a Asp93) z tohoto fragmentu mají vliv na formování vodíkových vazeb s rezidui Arg44 a Tyr96. Substitucí některých reziduí v daném fragmentu jinými dochází k úplné ztrátě katalytické aktivity, a to díky jejich vlivu na terciární strukturu enzymu (6, 39). Další aminokyselinové reziduum (Ser226) se nachází v blízkosti katalytické triády a přímo ovlivňuje vlastní katalytickou reakci. Náhradou tohoto rezidua ztrácí enzym svou katalytickou aktivitu (39). V ústí kavity katalytické podjednotky (14 Å vzdálené od katalytické triády) se nachází tzv. periferní vazebné

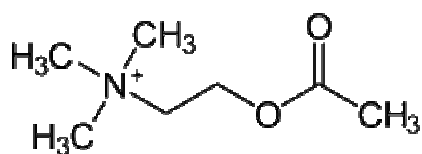
místo (Tyr70, Tyr121 a Trp279) (Obr 2). Toto periferní vazebné místo je složeno ze zbytků aromatických aminokyselin (39). Na toto místo se specificky váží aromatické a kationické inhibitory AChE a BuChE, které nejsou schopné proniknout do katalytické podjednotky k aktivnímu místu (galantamin, propidium dibromid, fascikuliny) nebo s dlouhými spojovacími řetězci (dekamethonium dibromid, bis-takriny, bis-huperziny) (4, 39, 32).



**Obr 2.** Struktura molekuly AChE – (a) katalytická triáda, (b) acylový „váček“, (c) vazebné místo cholinu, (d) periferní vazebné místo.

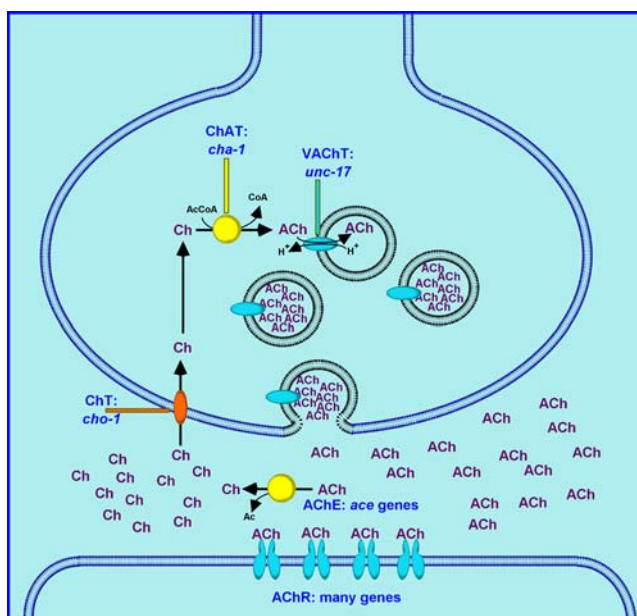
Molekula cholinesterázy také obsahuje minimálně sedm cysteinových aminokyselinových zbytků, z nichž šest formuje terciární strukturu (pomocí disulfidových můstků) a sedmý umožňuje tvorbu intermolekulárních kovalentních homodimerů (39).

AChE se významně podílí na přenosu nervového vzruchu. Ten je zprostředkovan pomocí neurotransmiterů neboli přenašečů. V případě převážné většiny neuronů nervové soustavy je neurotransmiterem ACh (Obr 3) (74). Hlavní úkol AChE je rychlé odbourávání ACh v synoptických štěrbinách.



**Obr 3.** Strukturní vzorec acetylcholinu.

Acetylcholinový receptor se skládá z pěti membránových jednotek, toto uskupení tvoří transmembránový kanál. Vazba ACh na obě podjednotky  $\alpha$  umožňuje otevření kanálu a přístup kationtů postsynaptickou membránou (Obr 4). Membrána se poté repolarizuje hydrolýzou ACh, která je katalyzována AChE (74). Dojde-li k inhibici AChE, hydrolýza ACh nemůže probíhat a dojde k jeho hromadění v synaptické štěrbině, nepřetržitému působení na postsynaptické receptory a tím kolapsu systému přenosu vzruchů.



**Obr 4.** Mechanismus přenosu nervového vzruchu

## 2.2 Hematoencefalická bariéra (HEB)

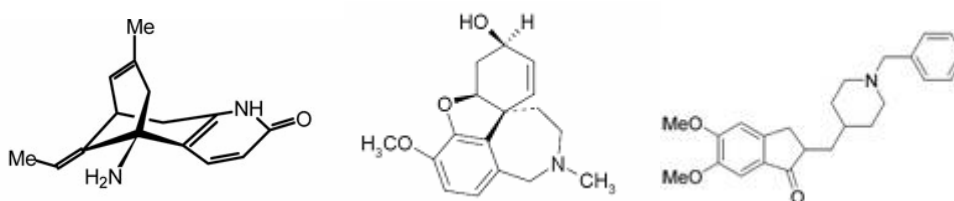
Hematoencefalická bariéra (HEB) je spojitá vrstva buněk kapilárních stěn v mozku, která hraje významnou roli při prostupnosti látek a nox do mozku. Vstup hydrofilních

látek do mozku je zásadně omezen přítomností HEB. Nicméně lipofilní látky mohou vstoupit do mozku transcelulární pasivní difuzí. Některé látky také prostupují HEB aktivně, např. pomocí transporterů (aminokyselin, P-glykoproteinu apod.) (75).

Ve výzkumu látek, které mají účinkovat v CNS je důležité, zda je jejich molekula schopna prostoupit HEB. Pro tyto látky je vstup přes HEB zásadní, zatímco pro látky účinkující na periférii, kdy mohou vykazovat vstup přes HEB pouze jako nežádoucí vedlejší účinek (75). Obecně vzato, hydrofilní (polární) molekula by přes HEB prostupovat vůbec neměla. Molekuly oximů jsou polární a kladně nabitě, a proto je jejich vstup přes HEB z pohledu farmakokinetiky nemožný.

### 2.3 Organofosforové inhibitory cholinesteráz (OFI)

K inhibici cholinesteráz může dojít působením celé řady látek přírodního nebo syntetického původu. Inhibitory se váží na aktivní místo, popř. také na periferní vazebné místo, nebo na obě místa zároveň (4, 39, 32). Inhibitory můžeme rozdělit na dvě skupiny. První z nich jsou tzv. reverzibilní inhibitory, které vytváří s enzymem slabé nevazebné interakce (donepezil, huperzin A, galantamin a takrin – Obr 5). Druhá skupina, tzv. ireverzibilní inhibitory, tvoří s aminokyselinami enzymu kovalentní vazby (organofosforové inhibitory) (39).



**Obr 5.** Příklady některých reverzibilních inhibitorů (od leva huperzin A, galantamin a donepezil).

OFI jsou organické sloučeniny fosforu, odvozené od kyseliny fosfonové (fosfonáty), fosforečné (fosfáty) nebo jejich thio-analogů (thiofosfonáty a thiofosfáty) (15, 39).

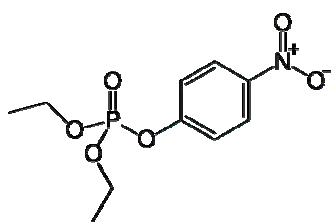
### **2.3.1 Organofosforové pesticidy a průmyslové látky**

OFI jsou v praxi užívány zejména jako pesticidy, ale také např. jako inhibitory hoření. Poprvé byly organofosfátové inhibitory vyvinuty ve 30. letech minulého století v Německu pro zemědělské účely (39). Dodnes jsou jako pesticidy využívány látky jako paraoxon, parathion, chlorpyrifos nebo diazinon. Jako inhibitor hoření se pak využívá např. *tris*-(2-butoxyethyl)-fosfát. OFI se také využívají průmyslově (tri-*o*-kresylfosfát) a medicíně jako lubrikanty. Na rozdíl od NPL je jejich toxicita výrazně nižší, protože u nich nedochází k ageingu, tedy k ireverzibilní vazbě na inhibovaný enzym.

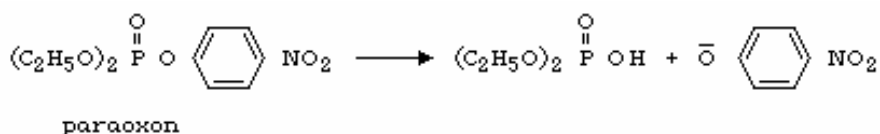
Otrava OFI je doprovázena celou řadou symptomů. Prvním je nevolnost, která bývá doprovázena zvracením, křečemi břicha, průjmem a nadměrným sliněním. Jako velmi časný znak se může projevit i hypotermie. Dále nastupují bolesti hlavy, závratě a celková slabost. Při nadýchání se mohou objevit také pocity těžkosti na prsou. Otrava je také doprovázena špatným viděním, slzením, miózou, spazmem ciliárního svalstva až bolestí očí a ztrátou koordinace. Objevit se může i tachykardie a brachykardie a vyskytnou se mohou různé druhy arytmií. Nastoupit může i ztráta koordinace, překotná řeč, záškuby svalů (částečně i jazyka a očních víček) a celková slabost. Otrava se také může projevit náhodnými trhavými pohyby, inkontinencí, náhlými kontrakcemi svalů a může nastat až koma. K smrti dochází na základě útlumu dechového centra v prodloužené míše, což je zároveň doprovázeno selháním dýchacích svalů a intenzivní bronchokonstrikcí (20).

### **PARAOXON**

Paraoxon (POX) je komerčně využíván jako insekticid (Obr 6). Připravuje se buď reakcí diethylchlorofosfátu s paranitrofenolátem sodným nebo nitrací diethylfenylfosfátu (20). POX je relativně velmi stabilní, a proto může dlouhou dobu zůstat v prostředí.



**Obr 6.** Strukturní vzorec paraoxonu.

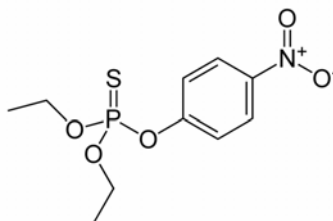


**Obr 7.** Metabolizace POX (© IPCS INCHEM – <http://www.inchem.org/>).

POX se, po perorálním podání, primárně metabolizuje na diethylfosfát a de-ethylparaoxon (Obr 7). Tyto látky lze detekovat v moči (20). POX není klasifikován jako karcinogenní.

## PARATHION

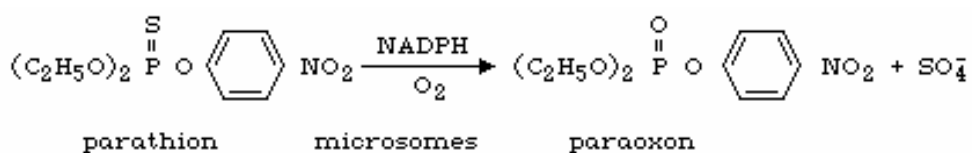
Parathion (Obr 8.) se komerčně využívá jako insekticid proti širokému spektru hmyzu, jako jsou mšice, roztoči (členovci), broukům, motýlům, hmyzu čeledi *Cicadellidae* a *Gracillaridae*. Dalším využitím parathionu je kontrola stavu hlístic na červené řepě a okrasných rostlinách.



**Obr 8.** Strukturní vzorec parathionu.



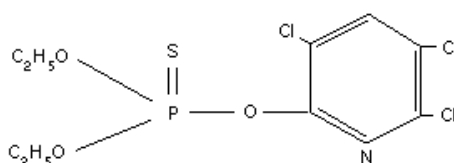
Tento insekticid se vyrábí reakcí diethyl-fosforochloridothionátu a p-nitrofenolátu sodného (20). Podle Mezinárodní zdravotnické organizace (WHO) je parathion klasifikován jako extrémně nebezpečný a podle dokumentu PIC Convention (Rotterdam Convention – 2005) se může export této látky uskutečnit pouze se souhlasem příslušných orgánů (importing Party) (20, 64). Parathion je klasifikován jako potenciální lidský karcinogen (20). Hlavním metabolitem parathionu je POX (Obr 9.).



**Obr 9.** Metabolizace parathionu na POX (© IPCS INCHEM – <http://www.inchem.org/>).

## CHLORPYRIFOS

Chlorpyrifos, neboli o,o-diethyl o-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) fosforothioát (Obr 10.) je komerčně využíván jako akaricid a insekticid (22). Používá se k hubení klíšťat, vší, dále k hubení hmyzu řádů *Homoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera* a *Coleoptera* (20, 71). Je používán na ošetření listů plodin, jako je řepka olejka, lilek brambor, rýže, tabák a bavlna.

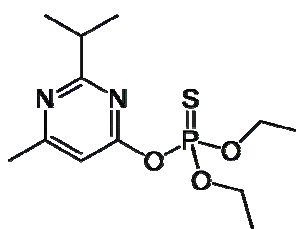


**Obr 10.** Strukturní vzorec chlorpyrifosu (© IPCS INCHEM – <http://www.inchem.org/>).

Chlorpyrifos se absorbuje z gastrointestinálního traktu (GIT), méně pak přes kůži a dýchací cesty. Zhruba 80% dávky je metabolizováno na 3,5,6-trichloropyridyl fosfát a 20% Na 3,5,6-trichloropyridinol. Tato látka není klasifikována jako karcinogen (20).

## DIAZINON

Diazinon (Obr 11), čili o,o-diethyl-o-(2-isopropyl-6-methylpyrimidin-6-yl) fosforothioát byl v minulosti používán jako nematicid, čili látka k hubení hlístů a hlístic, a insekticid na hubení švábů, mravenců, blech a rybenek v obytných budovách. V současné je jeho použití v některých částech světa úplně zakázáno (20, 70). Diazinon není klasifikován jako karcinogen.



**Obr 11.** Strukturní vzorec diazinonu.

### 2.3.2 Nervově paralytické látky

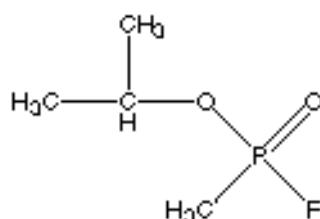
Nervově paralytické látky (NPL) jsou vysoce toxické organofosfáty, které byly zařazeny do skupiny tzv. bojových chemických látek (BChL) (55). Nástup účinků je velmi rychlý a tyto látky vstupují do organismu všemi branami vstupu. Obecně lze dále NPL rozdělit do dvou skupin; G – látky a V – látky (24). G – látky jsou viskózní kapaliny s různou mírou těkavosti a bez charakteristického zápachu (39). Jsou částečně rozpustné ve vodě a v organických rozpouštědlech. V důsledku vyšší těkavosti je nejpravděpodobnější branou vstupu dýchací systém. Bez stráty toxicity vydrží vterénu 12 až 14 hodin. Na druhé straně V – látky jsou málo těkavé kapaliny bez charakteristického zápachu (55). Vzhledem k jejich nízké těkavosti kontaminují tyto látky terén a vodu po dlouhou dobu.

Mezi G – látky patří např. cyklosarin, sarin, soman a tabun, mezi V – látky řadíme např. látky VX a VR. Pro bojové účely byla vyvinuta také látka GV (v americké armádě se používá kód GP), která se svým chemickým složením pohybuje mezi G a V – látkami [dimethylamido-O-(2-dimethylamino-ethyl)-fluorofosfonát] (55). Má

vyšší těkavost než V – látky, ale nižší než G – látky. Tato látka nikdy nebyla zavedena do výzbroje.

## SARIN

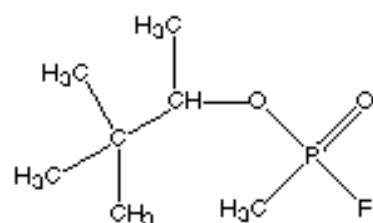
Sarin, neboli o-isopropyl-methyl-fosfonofluoridát, (Obr 12.), je bezbarvá, průhledná kapalina, většinou bez zápachu. Někdy může být cítit i slabě vonět po ovoci (20). Některými fyzikálně chemickými vlastnostmi se podobá vodě (míra odpařování apod.).



**Obr 12.** Strukturní vzorec sarinu (© CBWinfo - <http://cbwinfo.com/>).

## SOMAN

(3,3-dimethyl-n-but-2-yl) methylfosfonofluoridát, čili soman (Obr 13), je čirá bezbarvá kapalina, která má bezbarvé páry. Soman patří, společně se sardinem a tabunem, mezi tři neaktivnější G - látky, vyvinuté v Německu během druhé světové války (20).

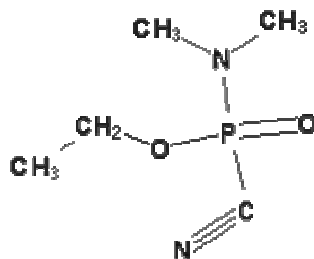


**Obr 13.** Strukturní vzorec somanu (© CBWinfo - <http://cbwinfo.com/>).

## TABUN

Tabun, neboli ethyl-N,N-dimethylfoforamidokyanidát (Obr 14), je čirá, bezbarvá kapalina bez chuti. Tato látka je snadno vyrobena reakcí dimethylamidofosforylu

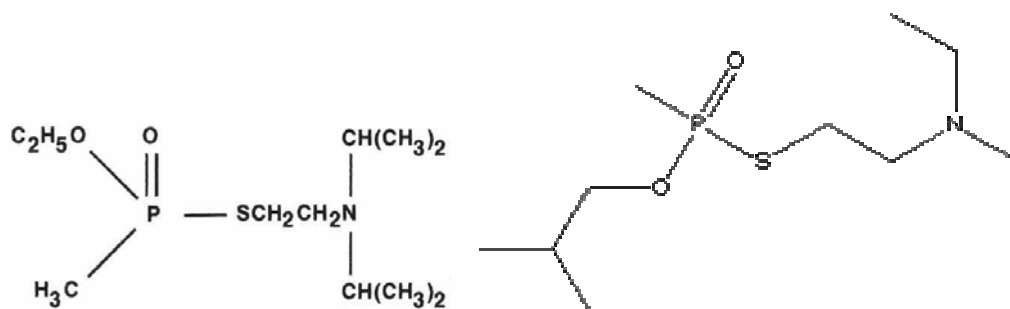
dichloridu a kyanidu sodného za přítomnosti etanolu, což dokazuje ten fakt, že NPL jsou velmi snadno dostupné díky nenáročnosti přípravy a její nízké ceny (55, 61). Je to kapalina, která má barvu až temně žluté, a zápachem se podobá hořkým mandlím. Díky přítomnosti –CN skupiny ve své struktuře je velmi špatně reaktivovatelný.



**Obr 14.** Strukturní vzorec tabunu (© Russian Munition Agency - [www.munition.gov.ru/images/tabun.gif](http://www.munition.gov.ru/images/tabun.gif)).

## VX, VR

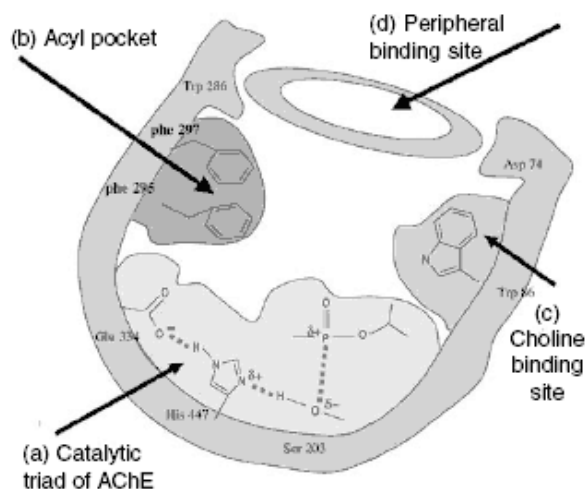
Látky VX a VR (Obr 15) jsou si podobné jak z hlediska struktury, tak z hlediska účinků. VX, čili o-ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl) methylfosfonothioát, je žlutě zbarvená kapalina bez zápachu a chuti. VR, čili o-isobutyl-S-(2-diethylaminoethyl)methyl fosfothioát, je stejně jako VX žlutá kapalina, bez chuti a zápachu.



**Obr 15.** Strukturní vzorce látek VX (vlevo) a VR (vpravo).

### 2.3.3 Toxikokinetika NPL

Všechny organofosforové inhibitory jsou ireverzibilními inhibitory AChE a BuChE. Tyto látky fosfonylují nebo fosforylují serinový hydroxyl v katalytické triádě (Ser203) (Obr 16.) a tím brání AChE plnit její fyziologickou funkci (39, 72). ACh se následně hromadí na v synaptické štěrbině a způsobuje permanentní podráždění nikotinových a muskarinových receptorů. To se pak systémově projevuje muskarinovými (mióza, porucha akomodace čočky, slzení, slinění, pokles krevního tlaku, brachykardie atd.), nikotinovými (svalová slabost, křeče kosterního svalstva atd.) a centrálními příznaky (bolest hlavy, závrať, emoční labilita, zvracení, útlum dechového centra, ztráta vědomí atd.) (39). Pokud nedojde po intoxikaci organofosfáty včas indikována léčba, rozvíjí se cholinergní krize. Ta pak může vyústit ve smrt v důsledku blokády dechového centra a paralýzy dýchacích svalů. K metabolickému rozvratu organismu však dochází, i když je cholinergní krize překonána. To se děje v důsledku hypoxie a acidózy (15, 39, 55).



**Obr 16.** Schéma AChE inhibované sarinem.

Cholinesterázy v krvi jsou prvním cílovým místem působení NPL. V krevním řečišti jsou přítomny nejen AChE a BuChE, ale také karboxylesterázy (CaE), které v případě otravy působí jako scavengery. Jsou schopny na sebe navázat NPL, a tím tak snižují jejich množství volného inhibitoru v krevním řečišti. Krví je pak OFI dopraven až

k cílovým místům jeho účinku – do CNS, na nervová zakončení vegetativního nervového systému a na nervosvalové ploténky. Byly popsány značné mezidruhové rozdíly v toxicitě NPL, tento jev je vysvětlován mezidruhově rozdílnými množstvími esteráz v krvi, které jsou schopny na sebe navázat NPL (3).

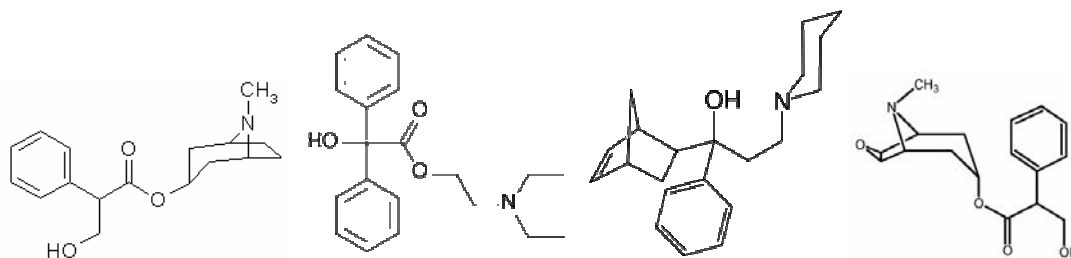
### **2.3.4 Toxikodynamika NPL**

NPL jsou z krevního řečiště eliminovány poměrně rychle, protože dochází k jejich hydrolyze. Např. isopropylmethylfosfonát, hlavní metabolit sarinu, je ve velkém množství vylučován močí s poločasem eliminace 3,7 hodiny, ale část také zůstává přítomna v tkáních. Cyklosarin se metabolizuje analogicky s poločasem eliminace 9,9 hodiny. Metabolismus somanu je však složitější a probíhá ve dvou fázích s poločasy eliminace 3,6 a 18 hodin. Soman je také jediný NPL, u které bylo zjištěno, že se vytváří jeho depa v tukových tkáních (3). V těchto depech nedochází k jeho inaktivaci, ale odkud se později uvolňuje opět jako toxická NPL. Sarin se v organismu distribuuje velmi rychle. Po aplikaci i.v. zvířatům je za jednu minutu detekovatelný v mozku, plicích, srdci, bránici, ledvinách a játrech (3). Distribuce NPL v mozku, kam se dostává zhruba 1 – 3% z celkového množství NPL v organismu závisí jednak na typu NPL (lipofilnější soman má vyšší afinitu k AChE než sarin), na prokrvení jednotlivých částí mozku a na také na aktivitě mozku v době expozice (3). U somanu i sarinu bylo zjištěno, že dochází k jejich akumulaci v hypotalamu, kde byla zjištěna 2 – 5x vyšší koncentrace než v ostatních částech mozku. Obecně platí, že látky typu G inhibují mozkovou AChE velmi rychle (50% inhibice během několika minut), zatímco u V – látek dochází k určitému zpoždění (k inhibici látkou VX dochází až po 20 minutách, protože se absorbuje hůře než sarin nebo soman) (2). Při otravách látkou VX je významná inhibice v kůře mozku a mozečku, v retikulární formaci mozkového kmene a ve většině jader hypotalamu a mesencefalu. Naopak mírná a pomalejší je inhibice v subkortikálních strukturách, především basálních gangliích. Sarin nejvýrazněji inhibuje AChE v mozkové kůře, pontu a prodloužené míše, nejméně postiženou částí jsou pak basální ganglia, kde k výraznější inhibici dochází až ve finálních fázích otravy. Inhibice AChE v mozku je tedy velmi selektivním procesem (3).

## 2.4 Současné trendy v profylaxi a terapii intoxikace OFI

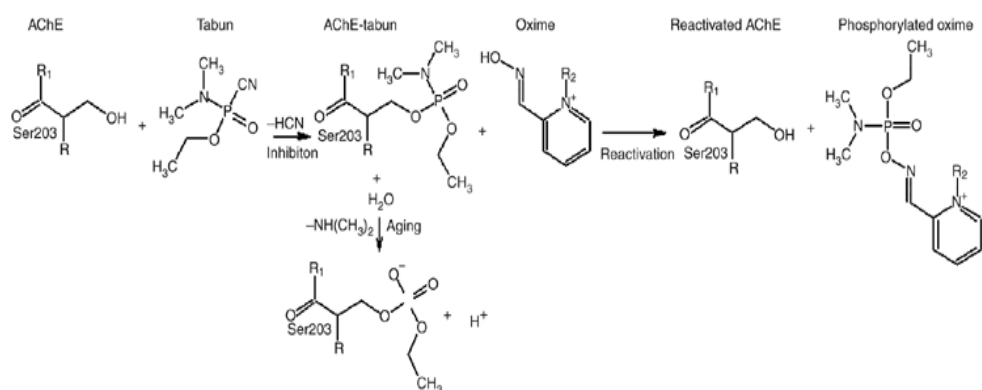
### 2.4.1 Terapie

Terapii lze rozdělit na symptomatickou, kauzální a doplňující. Při přípravě antidotních prostředků se obvykle využívá jejich kombinace (39, 55). Symptomatická terapie slouží k odstranění cholinergních příznaků intoxikace OFI. Pro tento účel jsou používána anticholinergika (parasymptolytika), jako jsou např. atropin, benaktizin, biperiden a skopolamin (Obr 17). Atropin antagonizuje navázání nahromaděného ACh především na periferních muskarinových receptorech, zatímco nikotinové příznaky ovlivňuje jen minimálně. Benaktizin, biperiden a skopolamin lépe prostupují přes HEB a mají tak lepší centrální účinky (2, 39, 55).



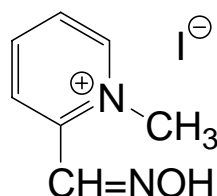
**Obr 17.** Anticholinergika používaná pro symptomatickou terapii – zleva atropin, benaktyzin, biperiden a skopolamin.

Pro účely kauzální léčby jsou používány reaktivátory AChE (12, 39, 35, 58, 68). Tyto látky mají ve své molekule nukleofilní hydroxyiminomethylovou (oximovou) funkční skupinu, která je v podobě oximátového anionu schopna štěpit vazbu organofosfát-AChE a obnovit funkci enzymu (Obr 18) (10, 39).



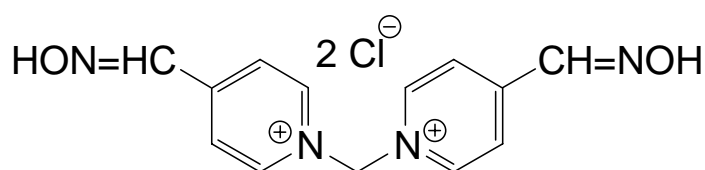
**Obr 18.** Schéma procesu inhibice AChE tabunem, stárnutí konjugátu AChE-tabun, a reaktivace inhibované AChE oximem (© Clinical Pharmacology & Therapeutics - [http://www.nature.com/clpt/journal/v82/n3/fig\\_tab/6100151f1.html](http://www.nature.com/clpt/journal/v82/n3/fig_tab/6100151f1.html))

Mezi komerčně dostupné reaktivátory patří pralidoxim (2-PAM, 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium chlorid, popř. methansulfonát) (Obr 19), methoxim (Renol<sup>®</sup>, MMC-4, 1,1-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)methan chlorid) (Obr 20), trimedoxim (TMB-4, 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)propan dibromid), obidoxim (Toxogonin<sup>®</sup>, 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropan dichlorid) (Obr 21) a HI-6 (Antiva<sup>®</sup>, 1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium) - 3 - (4 - karbamoylpyridinium) - 2- oxapropan dichlorid) (39, 55). Mezi další zástupce patří např. K-027, K-048, K-051, K-074, K-075 a K-102 (Obr 22). Všechny tyto reaktivátory, ale i řada dalších, byly syntetizovány a byla testována jejich schopnost reaktivovat AChE inhibované různými druhy inhibitorů (46, 21, 26, 27, 28, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 49, 50, 52, 54).

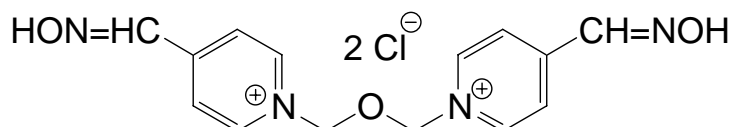


**Obr 19.** Strukturní vzorec pralidoximu (2-PAM).





**Obr 20.** Strukturní vzorec methoximu.

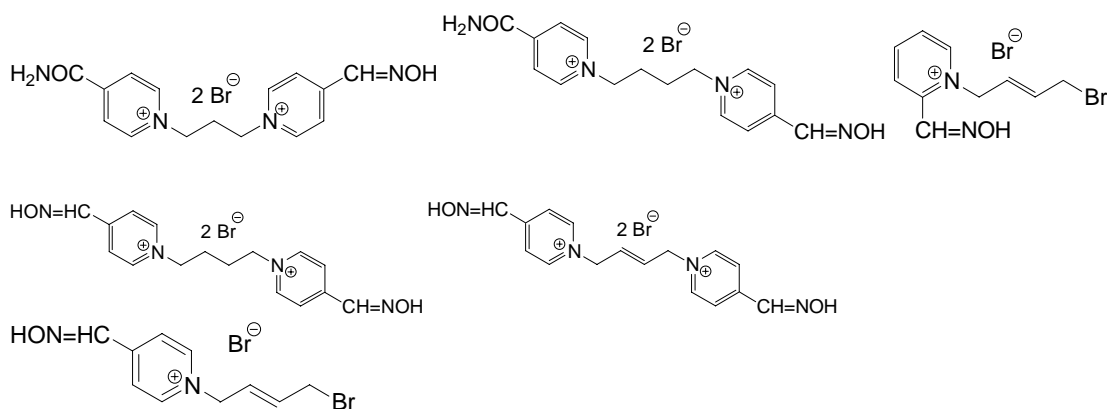


**Obr 21.** Strukturní vzorec obidoximu.

Základní kostru komerčně dostupných reaktivátorů tvoří alespoň jedno kvartérní pyridinové jádro, nejméně jedna oximová funkční skupina v poloze *ortho* nebo *para* na pyridinovém jádře a variabilní spojovací řetězec u biskvartérních sloučenin. Některé reaktivátory působí kromě reaktivace i jinými mechanismy účinků (např. u HI-6 byly objeveny agonistické vlastnosti na nikotinových receptorech) (35, 39).

K eliminaci dalších účinků organofosfátů je důležitá doplňující terapie. Antikonvulzivní terapie se používá kvůli zabránění tonicko-klonickým generalizovaným křečím. Zde je lékem volby diazepam, popř. alprazolam nebo klonazepam (39). V případě závažné intoxikace je také nutné aplikovat umělou ventilaci (oxygenoterapie) a regulovat metabolickou acidózu (infúze  $\text{NaHCO}_3$ ) (39).

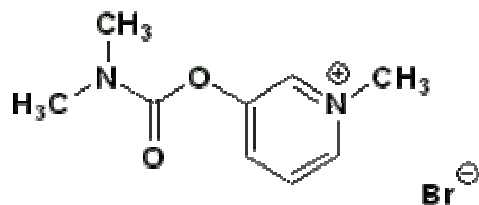
Všechny uvedené druhy terapie je vhodné kombinovat. V Armádě České republiky je zaveden kombinovaný i.m. autoinjektor Combopen I<sup>®</sup> (atropin, obidoxim) a Combopen II<sup>®</sup> (diazepam). Dále je k dispozici injekční roztok Chomol I<sup>®</sup> (atropin), lyofilizát Chomol II<sup>®</sup> (benaktyzin), lyofilizát Renol<sup>®</sup> (methoxim) a lyofilizát Antiva<sup>®</sup> (HI-6) (39, 55).



**Obr 22.** Strukturní vzorce některých nových reaktivátorů – zleva K-027, K-048, K-051, K-074, K-075 a K-102.

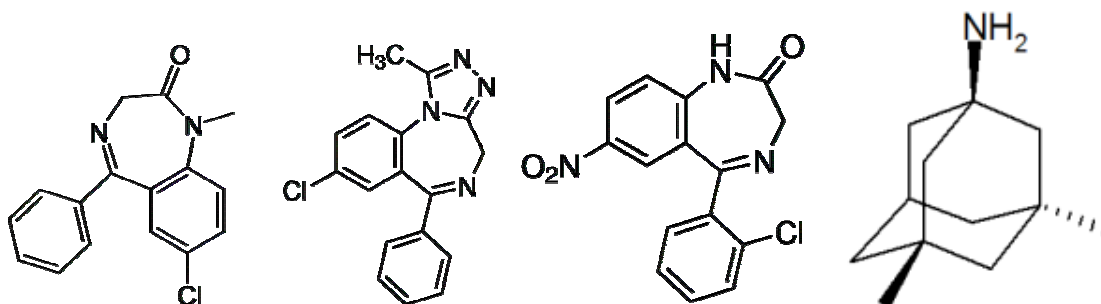
### 2.4.2 Profylaxe

Profylaktické přípravky jsou podávány osobám, u kterých jsou předpokládány otravy OFI. Takovými osobami jsou např. vojáci nebo zemědělci. Zároveň je prokázáno, že podání profylaktika zlepšuje účinnost postexpoziční terapie, pokud by byla podána. Mezi profylaktika jsou řazeny karbamáty (např. pyridostigmin) (Obr 23.), léčivý přípravek Panpal<sup>®</sup>, huperzin A nebo SAD-128. V tabletě přípravku Panpal<sup>®</sup> je obsažen pyridostigmin, benaktyzin a trihexyfenidil. Pyridostigmin zde plní úlohu periferního inhibitoru AChE, benaktizin s trihexyfenidilem pak působí jako centrální anticholinergika, svým terapeutickým účinkem umožňují snížit dávku (tedy i toxicitu) pyridostigminu a zároveň oslabují centrální cholinergní působení organofosfátů (39). Huperzin-A a SAD-128 jsou pak kompetitivní (reverzibilní) inhibitory.



**Obr 23.** Strukturní vzorec pyridostigminu (© CHEMGAROO, ChemgaPedia – <http://www.chemgapedia.de>).

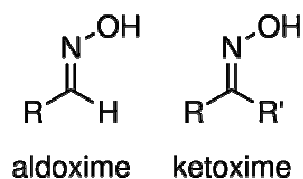
Další možností profylaxe je podání enzymů, které rozkládají molekulu OFI (1, 57). Tyto látky jsou však stále ve stádiu vývoje (7, 24). Pro účely profylaxe lze také použít látky, které mohou „vychytávat“ OFI v organismu, fungující jako bioscavengery (9, 57). Bioscavengery jsou látky, které na sebe váží noxu, takže snižují její množství v organismu. Literatura uvádí použití různých druhů cholinesteráz (AChE, BuChE), které se jeví jako velmi efektivní a bez nežádoucích účinků (1, 39). Profylakticky výhodné se v minulosti jevily také některé benzodiazepinové látky, nicméně jejich výsledný efekt byl nízký (57). Mezi látky, které byly testovány za účelem profylaxe, patřil např. diazepam, alprazolam, klonazepam (Obr 19.). U neuroprotektivních studií bylo však zjištěno, že profylaxe při použití memantinu (Obr 24.) zvyšuje výsledný efekt standardních antidot (16, 39, 57). Použitelné k profylaxi jsou také reaktivátory AChE, které se standardně používají k postexpoziční terapii otrav organofosfáty. Ve výzbroji Armády ČR jsou transdermální náplasti Transant<sup>®</sup>, ve kterých je obsažen oxim HI-6, jako profylaktikum (39, 55).



**Obr 24.** Strukturní vzorce látek, které byly testované za účelem profylaxe – zleva diazepam, alprazolam, klonazepam a memantin.

### 2.4.3 Reaktivátory AChE – oximy

Reaktivátory, obecně označované jako „oximy“ jsou látky, které slouží k převedení neaktivní inhibované formy AChE do původního stavu. Oximy jsou obecně označovány proto, že součástí jejich molekuly je oximová skupina (Obr 25). Tato je za pH lidské krve částečně disociována. Procesem částečné disociace vzniká oximátový anion, který je pak vlastním nukleofilem štěpícím vazbu mezi inhibitorem a enzymem (Obr 25).



**Obr 25.** Obecná struktura oximů

Z chemického hlediska se jedná o látky, které mají tyto společné rysy – přítomnost kvartérního dusíku, přítomnost aldoximové skupiny a u biskvartérních látek přítomnost spojovacího řetězce proměnlivé délky. Všechny tyto rysy jsou důležité nejen pro reaktivační účinnost oximu, ale také pro jeho distribuci v organismu. Přítomnost kvartérního dusíku v molekule reaktivátoru AChE je důležitá pro jejich afinitu k enzymu. Zvýšená afinita kvartérních látek k AChE je přisuzována jejich interakcím s anionickými místy enzymu (25, 56). Dalším strukturním faktorem ovlivňujícím reaktivační schopnost reaktivátorů AChE je, u biskvartérních zástupců, tvar a délka spojovacího řetězce mezi oběma kvartérními dusíky. Délka a tvar spojovacího řetězce sice nezasahují přímo do reaktivace, ovlivňují však významně reaktivační schopnost (25, 31, 53).

***Vliv přítomnosti kvartérního dusíku v molekule reaktivátoru na proces reaktivace***

Anionické centrum AChE váže nabitou kvartérní skupinu ACh (Obr 3) a rovněž také kvartérní ligandy včetně reaktivátorů. Přítomnost kladného náboje ve struktuře reaktivátoru AChE tedy umožňuje vstup do kavity jak intaktního, tak inhibovaného enzymu (25). Na druhé straně přítomnost tohoto kladného náboje znesnadňuje průchod reaktivátoru do CNS přes HEB. Ve většině případů je afinita biskvartérních (s dvěma kvartérními dusíky) větší než afinita monokvartérních (s jedním kvartérním dusíkem v molekule) (25). Je tedy zřejmé, že se zvyšujícím se počtem kvartérních dusíků bude reaktivace vyšší, ale prostup do CNS horší.

### *Vliv délky spojovacího řetězce mezi dvěma pyridinovými na proces reaktivace*

Tento strukturní rys se týká pouze bispyridiniových reaktivátorů AChE, kde existuje závislost délky spojovacího řetězce na užitém inhibitoru AChE. Tato závislost byla testována na AChE inhibované tabunem, cyklosarinem, sarinem a látkou VX. Ze závislosti vyplývá, že ideální délka spojovacího řetězce je v tomto případě tři až čtyři methylenové skupiny (25, 29, 30). Bohužel je toto pravidlo platné pouze pro n-methylenovou řadu, jelikož pokud se ve spojovacím řetězci vyskytne např. atom kyslíku, či jiné strukturní faktory lišící se od methylenové skupiny (např. but-2-en), ztrácí toto pravidlo svou platnost (25). Tento fakt může mít spojitost s přítomností zvýšené elektronové hustoty (volné elektronové páry,  $\pi$ -vazba) ve spojovacím řetězci a následnou interakcí těchto fragmentů molekuly s kavitou enzymu.

Efektivita reaktivace je závislá také na inhibitoru jako takovém. V případě sarinu je nejefektivnějším reaktivátorem TO-033 (30), v případě cyklosarinu je to pak methoxim, který má pouze jednu methylenovou skupinu (25). To je dáno rozdílnou strukturou inhibitoru.

**Tab. 1.** Reaktiváční účinnost některých reaktivátorů vůči AChE inhibované sarinem (30).

# koncentrace testovaných reaktivátorů  $10^{-5}$  M, \* koncentrace testovaných reaktivátorů  $10^{-3}$  M

Reaktivátor	Spojovací řetězec	Reaktivace [%]#	Reaktivace [%]*
Methoxim	CH <sub>2</sub>	2	21
TO 029	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	7	44
Trimedoxim	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	7	54
K 074	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	9	54
TO 047	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	20	34
TO 033	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	28	22

Obidoxim	CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub>	4	41
TO 052	CH <sub>2</sub> C(=O)CH <sub>2</sub>	2	44
TO 057	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	5	25
TO 058	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> S+(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	8	30
K 075	CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub>	13	42

### ***Vliv přítomnosti oximové skupiny ve struktuře reaktivátoru na proces reaktivace***

Přítomnost oximové skupiny ve struktuře reaktivátoru je dalším podstatným strukturním faktorem. Dříve se jako potenciální nukleofilní činidla zkoušely hydroxylamin, hydroxyiminoaceton, hydroxámové kyseliny, geminální dioly a ketoxímy. Jako nejvhodnější nukleofil se v současné době jeví aldoximová skupina (-CH=NOH). Tato skupina je v prostředí lidského organismu disociována na oximátový anion, který je vlastním nukleofilem, štěpícím vazbu mezi enzymem a organofosforovým inhibitorem (25).

### ***Vliv pozice oximové skupiny na proces reaktivace***

Dalším důležitým strukturním faktorem je pozice oximové skupiny na kvartérním pyridinovém jádře. Z výzkumů vyplývá, že existují určité rozdíly v reaktivační účinnosti, závislé na poloze oximové skupiny (25). Neexistuje však obecné pravidlo, že oximy umístěné v určité poloze jsou schopny reaktivovat všechny typy inhibicí NPL. Na druhou stranu je obecným pravidlem, že reaktivátory AChE s oximovou skupinou v poloze 3 nejsou tak účinné jako reaktivátory s oximovou skupinou v poloze 2 a 4. Ačkoliv neexistuje univerzální poloha oximové skupiny ideální pro reaktivaci všech organofosforových inhibitorů AChE, existují vztahy mezi polohou oximové skupiny a NPL. To znamená, že stejně jako u délky spojovacího řetězce, je efektivita reaktivace závislá na NPL. Např. cyklosarinem inhibovaná AChE je nejlépe reaktivovatelná reaktivátory s oximovou skupinou v poloze 2. Na druhou stranu v případě AChE inhibované tabunem jsou nevhodnější reaktivátory s oximovou skupinou v poloze 4 (25, 29).

### ***Vliv počtu oximových skupin v molekule reaktivátoru na proces reaktivace***

Jedna molekula reaktivátoru může obsahovat jeden, dva, tři nebo čtyři oximové skupiny na jednom, dvou či pyridinových jádrech. Počet oximových skupin však nezvyšuje reaktivační schopnost reaktivátorů AChE (25, 29). Tento fakt může být spojen se vzrůstající velikostí molekuly reaktivátoru a tím snížením komplementarity s enzymem.

### ***Vliv molekulární struktury reaktivátoru na prostupnost přes HEB***

Prostupnost molekuly reaktivátoru přes HEB je ovlivněno spoustou parametrů. Ukazuje se, že reaktivátory přes HEB prostupují, navzdory původním předpokladům (34, 58, 51). Podle nich by teoreticky polární, v tomto případě kladně nabitá molekula, neměla přes HEB prostupovat. Míra prostupnosti tedy není dána pouze podanou dávkou, ale také celou řadou molekulárních faktorů. Závislost prostupnosti reaktivátoru přes HEB je stále předmětem současných výzkumů a výsledky budou publikovány v brzké době.

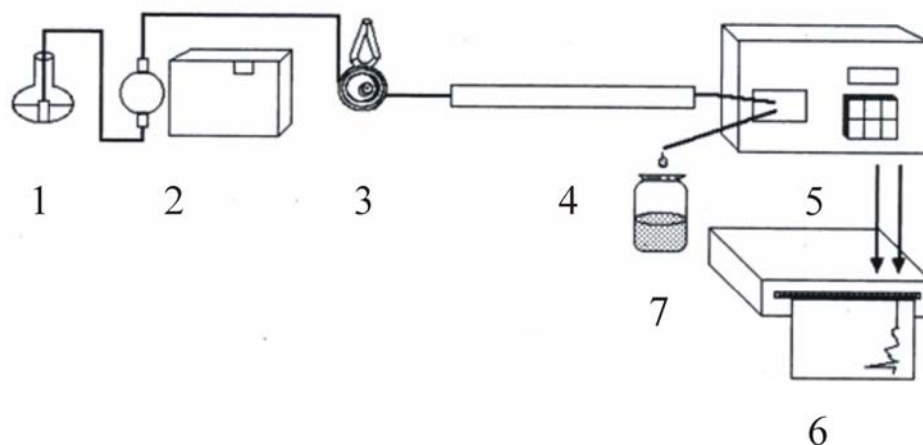
## **2.5 Teoretické základy vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)**

HPLC patří mezi tzv. separační analytické techniky, konkrétně chromatografické techniky. Principem separačních analytických metod je oddělit směs chemických látek, které bychom nebyli schopni bez separace stanovit. Základní separační technikou je extrakce. Ta se používá k separování jedné látky od ostatních látek ve směsi. Chromatografické techniky slouží k separaci jednotlivých složek v rámci směsi. Jednotlivé složky směsi se dělí mezi dvě fáze, jedou z nich je fáze stacionární (nepohyblivá) a druhá je mobilní (pohyblivá). Právě díky různé afinitě látek ke stacionární fázi se látky v koloně zadržují různě dlouho a mobilní fázi jsou transportovány ze systému různě rychle. Chromatografické techniky lze rozdělit na základě několika faktorů. Jedním z možných rozdělení je uspořádání stacionární fáze (sloupcová, plošná). Dalším, velmi důležitým faktorem, podle kterého můžeme chromatografické techniky dělit je mobilní fáze. Podle toho rozeznáváme chromatografii kapalinovou (LC, HPLC), kde mobilní fázi je kapalina, a plynovou (GC), kde mobilní fázi tvoří plyn. Vzhledem k tomu, že se tato práce zabývá metodikou HPLC, bude se tato kapitola omezovat pouze na teoretické základy této techniky a další chromatografické techniky nebudou zmiňovány.

### **2.5.1 Základní uspořádání HPLC**

Základní uspořádání HPLC se skládá z vysokotlaké kapalinové pumpy, injektoru, kolony, detektoru a vyhodnocovacího systému (Obr 26) (22, 33, 36, 37, 63).





**Obr 26.** Základní uspořádání HPLC (1 – zásobník mobilní fáze, 2 – vysokotlaká pumpa, 3 – injektor, 4 – kolona, 5 – detektor, 6 – vyhodnocovací zařízení, 7 – odpad).  
(© John Wiley & Sons Inc., 2007)

Mobilní fáze je ze zásobníku transportována do vysokotlaké pumpy skrze jednocestný ventil. Natlakovaná pumpou je mobilní fáze hnaná proti zpětnému tlaku z kolony přes druhý kontrolní ventil do injektoru. Natlakovaná mobilní fáze pak prochází přes injektor a do kolony. Po opuštění kolony pak vstupuje do detektoru a opouští systém do odpadu nebo se recykluje a je vracena zpět oběhu (36, 63).

Vzorek rozpuštěný v mobilní fázi nebo podobné kapalině jde nejprve do tzv. smyčky (angl. sample loop) a potom teprve do injektoru. Z injektoru se vzorek dostane do natlakovaného proudu mobilní fáze a prochází kolonou. V koloně se ustanovuje rovnováha mezi stacionární fází a vzorkem. Tím dochází k separaci jednotlivých frakcí ve směsi. Separované frakce pak vstupují skrz konec kolony do detektoru. Detektor registruje změnu koncentrace jako změnu signálu napětí. Tyto změny napětí v čase jsou pak registrovány vyhodnocovacím zařízením jako chromatogram. Na chromatografu pak můžeme vidět píky, které představují detekované frakce směsi (36, 37).

## 2.5.2 Separační modely

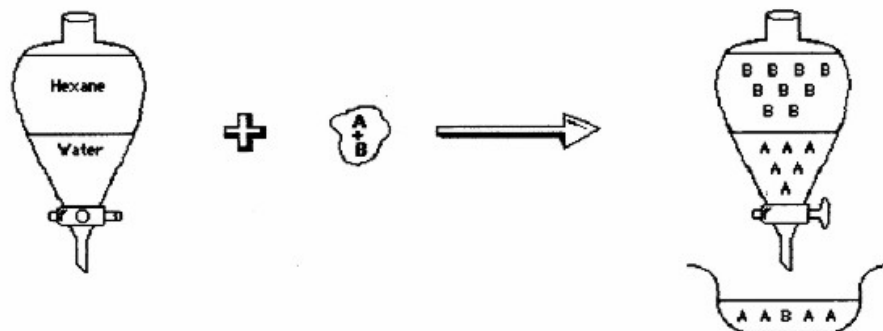
V systému HPLC jsou používány tři typy separačních modelů: partition, size exclusion chromatography a ion exchange (36).

### PARTITION

K separaci na koloně dochází, když vzorek v mobilní fázi začne interagovat se stacionární fází. Mechanizmy těchto interakcí pravděpodobně zahrnují síly, vyvolané uspořádáním hustoty náboje v polárních sloučeninách, jako je např. voda. Díky přitažlivé síle elektronu v atomu kyslíku a vazebnému úhlu vodíků a kyslíku, vykazuje molekula vody kladně nabitý a záporně nabitý konec. Molekula vody se nachází v minimálním energetickém stavu v tom případě, když je její kladně nabitý konec v pozici směrem k záporně nabitému konci jiné molekuly vody. Toto uspořádání vede k vazbě jednotlivých polárně nabitých molekul k sobě.

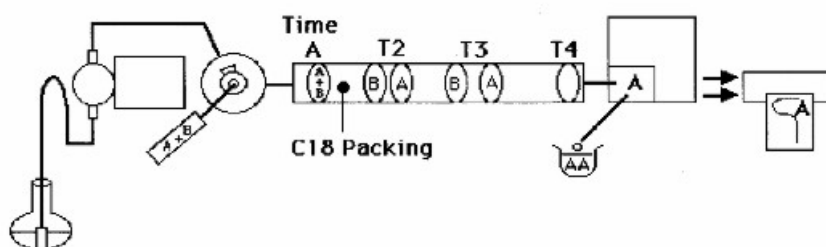
Když však nepolární molekuly vstoupí do polární matrice, budou se orientovat způsobem, vedoucím k maximalizaci polárních interakcí. Výsledkem tohoto bude to, že nepolární molekuly budou nahuštěny na sebe (36). Principem tohoto chování je pravidlo, že podobné má afinitu k podobnému, takže polární molekuly budou mít vždy vyšší afinitu k polární matrici a nepolární k nepolární matrici. Náplň kolony (stacionární fáze) má vždy různou afinitu k různým látkám, v závislosti na stupni jejich polarizace. Když pak mobilní fáze kontinuálně opouští kolonu, jednotlivé látky jsou vymývány v rozdílných časových intervalech nástřiku (36, 63).

Dobry příklad tohoto typu separačního modelu je separace v dělicí nálevce při extrakci kapalina – kapalina (36, 60). Separace pak probíhá na základě ustanovení rovnováhy mezi jednotlivými, vzájemně nemísitelnými kapalinami a separovanou látkou. Pokud existují dostatečné rozdíly mezi polaritami jednotlivých separovaných látek, každá z nich pak bude mít tendenci se koncentrovat v roztoku s podobnou polaritou (Obr 27).



**Obr 27.** Příklad separace směsi v dělicí nálevce (© John Wiley & Sons Inc., 2007)

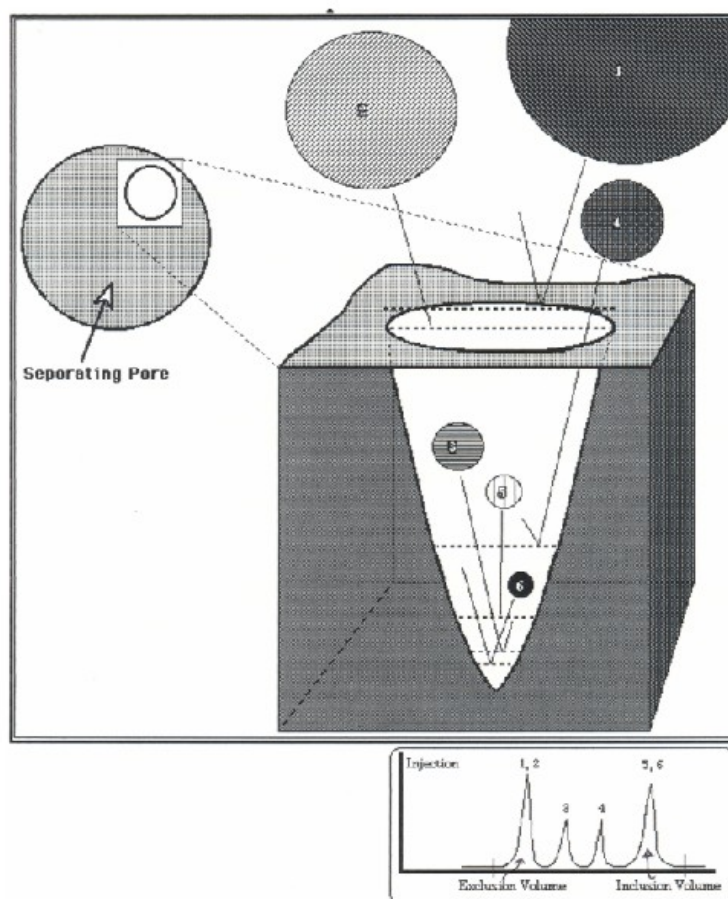
Stejným způsobem dochází k separaci v koloně v rámci HPLC. Zde je polární buď mobilní nebo stacionární fáze a přitahuje a váže více polárnější sloučeniny v injektované směsi. Představme si, že polární je fáze stacionární a kolonou prochází nepolární mobilní fáze, a že ve směsi jsou dvě látky s různou polaritou. Obě tyto látky mají určitou afinitu ke stacionární fázi, a proto budou v koloně zadržovány. Nicméně látka s vyšší polaritou bude v koloně zadržována déle. Při ustanovení rovnováhy ve prospěch pohybující se mobilní fáze, méně polární látka se bude z kolony vymývat rychleji a bude eluována první (Obr 28) (36).



**Obr 28.** Schéma separace na koloně, model partition (© John Wiley & Sons Inc., 2007)

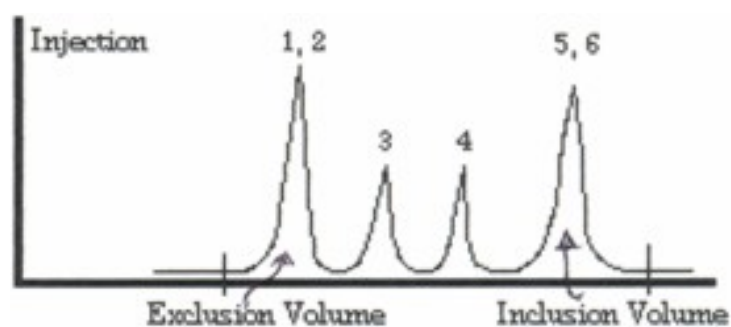
## SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY

První komerčně prodaný HPLC systém byl gel penetration chromatography (GPC) neboli chromatografická separace na principu velikosti. Tento nejjednodušší chromatografický systém je založen na separaci na základě velikosti molekul (59). Stacionární fáze je uspořádána jako kuličky obsahující zužující se póry. Když mobilní fáze transportuje vzorek k těmto pórům, rozpuštěné látky procházejí skrz póry, pokud je velikost molekul dostatečně malá, aby prošly (Obr 29) (36). Jestliže jsou molekuly větší než pór, jsou vymývány z kolony (exclusion volume).



**Obr 29.** Schéma size exclusion separation (© John Wiley & Sons Inc., 2007)

Velké molekuly, které pórem prošly, se nemohou dostat hluboko do póru. Menší molekuly prošly hlouběji. Výsledkem je delší eluce menších částic. V praxi to znamená, že opouštějí kolonu později (inclusion volume) (22, 33, 36). Na chromatografu pak vidíme tři typy píků. Prvním je exclusion volume, což jsou molekuly větší než pór, další jsou píky látek se střední velikostí molekul a poslední, tzv. inclusion volume, jsou píky látek s nejmenší velikostí (Obr 30).



**Obr 30.** Chromatogram size exclusion separace (1, 2 – exclusion volume, 3, 4 – píky molekul středních velikostí, 5, 6 – inclusion volume) (© John Wiley & Sons Inc., 2007)

## ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY (IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRAFIE)

Tato metoda používá typ a stupeň ionizace kolony a látek k dosažení separace. Zde neplatí pravidlo, že podobné se mísí s podobným, ale naopak. Látky s opačným nábojem, než je náboj kolony, budou přitahovány a zadržovány v koloně. Eluce je pak zajišťována vytěsněním nadbytkem iontu, který má stejný náboj jako navázaná sloučenina (36). Čím pevnější je vazba sloučeniny na kolonu, tím pomalejší je eluce z kolony.

Při přípravě iontově výměnné kolony (stacionární fáze) se používá celá řada materiálů zahrnujících silikagel a zirkon a pevně spojené organické polymery (36). Navázané na tyto materiály jsou organické substance, které obsahují funkční skupiny buď s permanentním nábojem nebo s možností indukce náboje změnou pH.

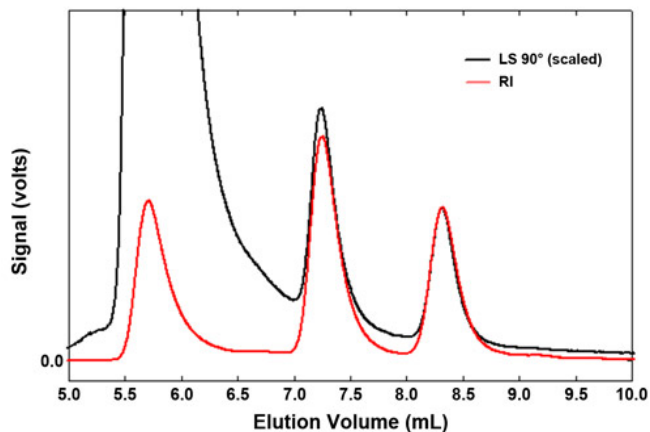
Nabité funkční skupiny, které dávají koloně schopnost separace, jsou dvojího typu: anionické a kationické. Anionické materiály mají afinitu k aniontům a mají na svém povrchu kladně nabitě funkční skupiny, nejčastěji organické aminy. Kationické materiály váží kationty svými záporně nabitými funkčními skupinami, zejména kyselinami a sulfonáty (36). Oba typy kolon můžeme ještě dále dělit na silné a slabé typy kolon a to na základě stability a permanence náboje na funkčních skupinách. Silné typy mají buď permanentní náboj (např. kvartérní aminy) nebo mají přítomný náboj v celém spektru pH, používaném v HPLC (např. sulfonové kyseliny). Na druhé straně slabé typy mají na funkčních skupinách náboj indukovatelný, a to v závislosti na změně pH. Příkladem mohou být organické kyseliny, které jsou při pH 2,0 neutrální (nenabitě), ale při pH 6,5 tvoří kationty.

### **2.5.3 Modifikace separačního modelu „partition“ – reverzní chromatografie s použitím silikagelu, jako stacionární fáze**

Vzhledem k tomu, že HPLC metodika, použitá při stanoveních oximů v biologických materiálech pro účely této práce, je založena na separačním modelu „partition“, je zde zařazena kapitola o modifikacích této metodiky. Reverzní chromatografie znamená, že stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je polární.

Při separaci oximů z biologického materiálu můžeme čelit dvěma základními problémům. Jsou to špatná retence a zeslabení. Chromatografické píky jsou potom asymetrické a mají tendenci se rozšiřovat nebo zeslabovat na straně od nástřiku (Obr 31). Výsledkem tohoto rozšiřování je tendence píků překrývat sousední píky látek, které se v koloně zdržují déle. Extrémní rozšiřování, které je vždy v důsledku špatně nebo chabě ustanovené rovnováhy v koloně, musí být vyřešeno již před samotným nástupem separace. Jednou z nejběžnějších příčin rozšiřování je částečná ionizace buď materiálu v koloně nebo vzorku v mobilní fázi (24, 36). Příkladem může být proces disociace kyselin, kdy při  $pK_a$  kyseliny je nedisociovaná a disociovaná forma látky v rovnoměrné koncentraci. Jestliže upravíme  $pK_a$  mobilní fáze stabilizačním roztokem (pufrem) a potom se budeme pokoušet o separaci disociované kyseliny od ostatních

látek směsi, výsledkem bude velmi rozšířený pík, tím, že se kolona bude snažit separovat obě rovnovážné formy kyseliny.



**Obr 31.** Ukázka rozšiřování píku (© AAPS Journals, 2006)

Dalším problémem jsou sloučeniny, které jsou příliš rozpustné na to, aby se udrželi na koloně a odcházejí neidentifikované ve „prázdném“ objemu. Modifikace buď ionizace vzorků nebo povrchu kolony může zvýšit retenci, a tak zlepšit řešení a výsledek. Modifikacemi, které vedou k vyřešení tohoto problému jsou potlačení ionizace a iontové párování. (36).

## POTLAČENÍ IONIZACE

Pufry se používají v HPLC k kontrole ionizace (disociace) jedné nebo více molekul v roztoku, tak aby se byly separovány v podobě ostrých a nerozšířených píků. Klíčem k pochopení ionizace je pochopení pojmu pH a  $pK_a$ . pH roztoku je charakterizováno koncentrací (aktivitou) oxonyových iontů v roztoku a reprezentuje stupeň kyselosti kyseliny nebo zásaditosti báze. Při stoupajícím pH, klesá koncentrace oxonyových iontů a naopak. Neutrální pH je 7.  $pK_a$  pro každou ionizovatelnou skupinu na molekule je pH, při kterém jsou v rovnováze koncentrace ionizované a volné formy látky. Organické kyseliny mají  $pK_a$  kolem pH 4,5, aminy kolem pH 9,0 a 10,5. Pod pH 2,5 existují kyseliny pouze ve své volné, nedisociované podobě. Při pH na 6,5 je vodíkový kation

oddělen od molekuly, takže kyselina je disociovaná. Je tedy zřejmé, že nezávažnější rozšiřování píků bude přesně při  $pK_a$ .

Nejpoužívanějším pufrům v HPLC je tzv. fosfátový pufr. Ten má dvě použitelná  $pK_a$ , 2,1 a 7,1 a je UV transparentní. Další pufrы, používané v HPLC, jsou acetát,  $pK_a$  4,8, formát,  $pK_a$  3,8 a chloroacetát,  $pK_a$  2,9, všechny absorbují UV pod  $\lambda$  225nm. Při analýze vzorků, obsahujících organické fosfáty, může být fosfát nahrazen sulfonátem s  $pK_a$  1,8 a 6,9.

Dalším faktorem je efekt ionizace na rozpustnost. Ionizované formy jsou lépe rozpustné ve vodných roztocích. Pokud potřebujeme zvýšit retenci látky v reverzní koloně, převedeme ji do neionizované formy. Např. pro malé organické kyseliny je nejlepší separace při pH 2,5 s fosfátovým pufrům nebo použitím 100mM kyseliny octové, která poskytuje pH 2,9 (24, 36).

## **IONTOVÉ PÁROVÁNÍ**

Iontově párová činidla jsou opačně nabitě organické látky, jako je hexansulfonát, oktansulfonát apod., které se do mobilní fáze přidávají v přebytku (obvykle 30 – 100mM). Jeden z možných výkladů důvodu použití těchto látek je ten, že s látkami ve vzorku, obvykle aminy, tvoří iontové páry a tím vytvoří jednu dlouhou pseudomolekulu s „maskovaným“ nábojem uprostřed této molekuly (36). Potom separace probíhá jako by náboj na molekule vůbec neexistoval. Tím dosáhneme také posunutí retenčního času a případné oddělení od jiných, nežádoucích látek ve směsi (např. proteinů). Čím delší je pak nepolární řetězec iontově párového činidla, tím vyšší je retenční čas.

### **2.5.4 Možnosti detekce v HPLC**

V rámci metodiky HPLC je možné použití několika typů detektorů. Mezi ně patří i ultraviolet – visible spectra detektor (UV-VIS), který byl pužit v experimentální části této práce, a proto je mu věnována největší pozornost. Ostatní detektory jsou zmíněny pouze heslovitě. Mezi ně patří fluorescenční detektor (FLD), photodiode array detektor



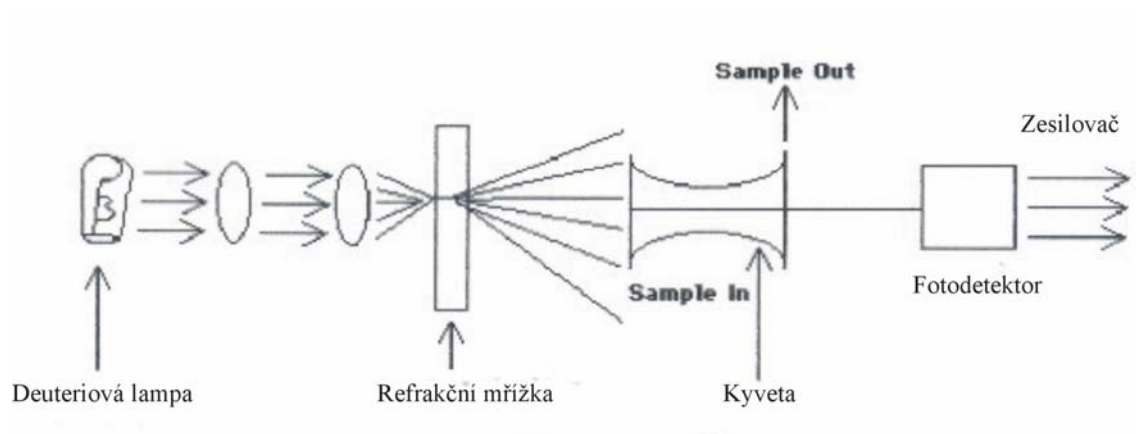
(PDA), hmotnostní detektor (MS), elektrochemický detektor (ECD) a např. evaporative light scattering detektor (ELSD). Nejcitlivější z nich je MS a ELSD, nicméně metodika použitelná pro ně je velmi náročná a vyžaduje speciální podmínky (mobilní fáze, tlak na koloně apod.).

## **DETEKTOR UV/VIS**

Tento detektor využívá princip absorpce světla v oblasti ultrafialové a viditelného světla. Absorbance je pak úměrná koncentraci stanovované látky. Princip je založen na Lambert Beerovu zákonu. Ten říká, že prochází-li tok rovnoběžných monochromatických paprsků o určité zářivé energii ( $\Phi_0$ ), homogenní vrstvou délky ( $l$ ), dochází k určité absorpaci záření a z homogenní vrstvy vychází paprsek se sníženou zářivou energií ( $\Phi$ ). Koncentrace ( $c$ ) je pak úměrná absorpaci ( $A$ ), molárnímu absorpčnímu koeficientu ( $\varepsilon$ ) a délce homogenní vrstvy ( $l$ ). Vztah je pak možné vyjádřit jako:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot l$$

Detektoru zahrnuje zdroj záření, refrakční mřížku, kyvetu, fotodetektor a zesilovač (Obr 32). Jako zdroj záření se používá deuteriová lampa, která poskytuje přijatelnou intenzitu záření od 190 do 400nm (22, 24, 66). Když je potřeba měření v oblasti viditelného světla (400 až 700nm), často se používá wolfram-halová lampa. Nicméně většina měření v HPLC probíhají ve vlnových délkách pod 400nm, proto je většinou potřeba pouze deuteriové lampy. Záření z lampy pak prochází do kyvety, která je napojená na kolonu a namířená na diodu, která pak měří intenzitu ( $\Phi$ ) záření. Obvykle bývá záření z lampy ještě měřeno referenční diodou, pro získání původní intenzity ( $\Phi_0$ ). Elektronický systém detektoru pak převede signál z obou diod na absorbanci, která je pak převedena do data systému (66).



**Obr 32.** Základní uspořádání detektoru UV/VIS (© John Wiley & Sons Inc., 2007)

## **3. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA**

### **3.1 Cíl práce**

Cílem této práce bylo stanovit koncentrace oximů v CNS a plazmě laboratorních potkanů a výsledky potom podrobit základnímu statistickému zpracování. Dalším cílem bylo sledovat koncentrace zvolených oximů v různých částech mozku (frontální kůře, bazálních gangliích, pontomedulární oblasti a cerebellu).

### **3.2 Hypotéza**

Oximy mohou prostupovat přes hematoencefalickou bariéru i při aplikaci terapeutických dávek.

## 4. METODIKA

### 4.1 Experimentální model

Cílem práce bylo stanovit koncentrace vybraných reaktivátorů (oximů) v mozku a plazmě potkanů (kmen Wistar). Pokusy byly prováděny na samicích potkana kmene Wistar (ANLAB, Praha, Česká republika), jejichž hmotnost se pohybovala v rozmezí 230–280 g. Zvířata byla před pokusem nejméně 1 týden ustájena v centrálním viváriu Fakulty vojenského zdravotnictví, které je klimatizované s dvanáctihodinovým světelným režimem střídání světlo – tma (od 7:00 do 19:00). Pokusná zvířata byla krmena standardní peletovou dietou a vodou *ad libitum*.

Zvířata byla rozdělena do skupin po 5 jedincích. Experimenty byly schváleny Etickou komisí Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové Univerzity obrany v Brně a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové UK v Praze v souladu s vyhláškou 207/2004 Sb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

Personál manipulující se zvířaty byl předem proškolen a získal osvědčení o způsobilosti pracovat s laboratorními zvířaty podle §17 odst. 1 zákona 207/2004.

Pro účely hodnocení prostupů přes HEB byly vybrány čtyři reaktivátory – HI-6, K-027, K-74 a TO-032 (trimedoxim). K analýzám bylo použito pět vzorků pro každý reaktivátor. Všem pěti potkanům bylo podáno 0,1 ml roztoku na 100 g jejich hmotnosti, obsahující terapeutické dávky (5% LD<sub>50</sub>) reaktivátoru (Tab. 2), a to i.m. do pravého zadního stehna. Po 60 min. byla zvířata utracena v CO<sub>2</sub> atmosféře a byla odebrána krev z levé komory srdeční. Pak byla u zvířat provedena perfúze cévního systému fyziologickým roztokem po dobu 12 min. Po ukončení perfúze byl vyjmut mozek. Okamžitě byla provedena vizuální kontrola vykrvení mozkové tkáně. Mozky byly poté ihned zmrazeny na -80 °C (ULTF 320, Dairei, Dánsko) a uchovány až do doby před samotnou analýzou. Srážlivost krve byla upravena přidáním standardního množství EDTY, poté byla centrifugována (3000 ot./min, 15 min) (M-24 A, Boeco, Německo). Po oddělení krevních elementů byla odebrána plasma, která byla ihned uložena

v – 80 °C (ULTF 320, Dairei, Dánsko) a byla uchovávána až do doby další úpravy před samotným měřením.

Mozek byl dále rozdělen na čtyři části. Reaktivátory byly stanovovány ve frontální kůře, bazálních gangliích, pontomedulární oblasti a mozečku. Pro účely stanovení byla zvolena metodika HPLC-UV/VIS.

Vzhledem k tomu, že kromě HI-6 nebyl v mozku žádný jiný reaktivátor stanoven, byly použity jen dva vzorky mozku (K-027, K-074 a TO-032). Zbylé vzorky byly ponechány pro další analýzy s použitím citlivějších detektorů.

**Tab. 2.** Přehled testovaných reaktivátorů a jejich terapeutických dávek

<b>Název reaktivátoru</b>	<b>Terapeutická dávka 5%LD<sub>50</sub></b>
<b>HI-6</b>	39.0 mg/kg
<b>K-027</b>	22.3 mg/kg
<b>K-074</b>	23.0 mg/kg
<b>TO-032 (trimedoxim)</b>	7.5 mg/kg

## **4.2 Příprava vzorků**

### **4.2.1 Příprava plasmy po aplikaci reaktivátoru**

Přímo ze srdce odebraná plná krev byla ošetřena standardní dávkou EDTA a centrifugována 15 minut při 3.000 rpm (M-24 A, Boeco, Německo). Byla odebrána plazma a ta byla uložena při - 80 °C (ULTF 320, Dairei, Dánsko).

Vzorek plasmy byl rozmražen a automatickou pipetou byl odebrán přesný objem. K němu byla přidána 20% TCA (tetrachlórctová kyselina) v množství  $\frac{1}{5}$  objemu plasmy. Tabulka 5 shrnuje všechny měřené vzorky plasmy, odebraný objem, objem přidané 20% TCA a výsledný celkový objem. Přidáním TCA došlo k vysrážení

přítomných proteinů. Vzniklá sraženina byla 1 minutu roztřepávána na minitřepačce (Lab Dancer, IKA-WERKE, Staufen, Německo). Po rozmíchání byla 4 minuty centrifugována při 10.000 rpm. Supernatant byl odebrán a použit pro HPLC analýzu. Analýzy probíhaly při teplotě 23°C.

**Tab. 5.** Přehled vzorků plasmy – odebrané objemy, přídavky 20% TCA a celkové objemy

<b>Reaktivátor</b>		<b>Odebraný objem plasmy (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Přídavek 20% TCA (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Výsledný celkový objem (<math>\mu</math>l)</b>
<b>HI-6</b>	<b>Vzorek č.</b>			
	1	180	36	216
	2	160	32	192
	3	235	47	282
	4	355	71	426
	5	345	69	414
<b>K-027</b>	1	255	51	306
	2	115	23	138
	3	180	36	216
	4	280	56	336
	5	160	32	192
<b>K-074</b>	1	205	41	246
	2	160	32	192
	3	270	54	324
	4	160	32	192
	5	190	38	228
<b>TO-032</b>	1	220	44	264
	2	265	53	318
	3	225	45	270
	4	305	61	366
	5	240	48	288

#### 4.2.2 Příprava mozku po aplikaci reaktivátoru

Ihned po odebrání byl mozek zmražen na - 80 °C a uchován k analýze. Po vyjmutí a částečném rozmražení byl rozdělen na čtyři části, které byly samostatně homogenizovány a připravovány k analýze. Frontální kůra (FC) byla skalpelem odříznuta jako první. Poté byla vyjmuta bazální ganglia (BG) a nakonec oddělena pontomedulární oblast (PM) od mozečku (Ce) a zbytku mozku.

Mozková tkáň byla homogenizována (T25 Ultra-Turrax, IKA, Německo) s destilovanou vodou v poměru 1:4 (w/v). Byl odebrán přesný objem homogenátu a k němu byla přidána 20% TCA v množství  $\frac{1}{4}$  množství homogenátu. Vzniklá sraženina byla 1 minutu roztřepávána na minitřepáče (Lab Dancer, IKA-WERKE, Staufen, Německo). Po rozmíchání byla 4 minuty centrifugována při 10.000 rpm. Supernatant byl odebrán a použit pro HPLC analýzu. Analýzy probíhaly při teplotě 23°C. Tabulka 6, 7, 8 a 9 shrnuje hmotnosti jednotlivých odebraných částí mozku, přísadků vody pro homogenizaci, odebraný objem homogenátu, přísadek 20% TCA a celkový objem.



**Tab. 6.** HI-6 – mozek

<b>Vzorek č.</b>	<b>Část mozku</b>	<b>Hmotnost (g)</b>	<b>Přídavek H<sub>2</sub>O (μl)</b>	<b>Odebraný objem (μl)</b>	<b>Přídavek 20% TCA (μl)</b>	<b>Celkový objem (μl)</b>
<b>1</b>	FC	0,0759	304	300	75	375
	BG	0,0569	228	200	50	250
	PM	0,1153	462	500	125	625
	Ce	0,2332	932	500	125	625
<b>2</b>	FC	0,0725	290	300	75	375
	BG	0,0894	358	300	75	375
	PM	0,1154	462	500	125	625
	Ce	0,2277	911	500	125	625
<b>3</b>	FC	0,0488	195	200	50	250
	BG	0,074	298	200	50	250
	PM	0,1229	492	500	125	625
	Ce	0,2260	904	600	150	750
<b>4</b>	FC	0,0709	284	300	75	375
	BG	0,0919	368	300	75	375
	PM	0,1518	607	600	150	750
	Ce	0,2918	1168	800	200	1000
<b>5</b>	FC	0,0684	274	300	75	375
	BG	0,1450	580	400	100	500
	PM	0,1761	704	600	150	750
	Ce	0,2721	1088	800	200	1000

**Tab. 7.** K-027 – mozek

Vzorek č.	Část mozku	Hmotnost (g)	Přídavek H <sub>2</sub> O (μl)	Odebraný objem (μl)	Přídavek 20% TCA (μl)	Celkový objem (μl)
<b>1</b>	FC	0,076	304	200	50	250
	BG	0,0781	312	200	50	250
	PM	0,0943	377	400	100	500
	Ce	0,2202	881	600	150	750
<b>2</b>	FC	0,0766	306	200	50	250
	BG	0,1049	420	300	75	375
	PM	0,1235	494	600	150	750
	Ce	0,2455	982	600	150	750

**Tab. 8.** K-074 – mozek

Vzorek č.	Část mozku	Hmotnost (g)	Přídavek H <sub>2</sub> O (μl)	Odebraný objem (μl)	Přídavek 20% TCA (μl)	Celkový objem (μl)
<b>1</b>	FC	0,0676	270	300	75	375
	BG	0,1139	456	400	100	500
	PM	0,1056	422	400	100	500
	Ce	0,2295	918	600	150	750
<b>2</b>	FC	0,0565	226	200	50	250
	BG	0,1085	434	400	100	500
	PM	0,1962	785	800	200	1000
	Ce	0,2882	1153	1000	250	1250

**Tab. 9.** TO-032 – mozek

Vzorek č.	Část mozku	Hmotnost (g)	Přídavek H <sub>2</sub> O (μl)	Odebraný objem (μl)	Přídavek 20% TCA (μl)	Celkový objem (μl)
1	FC	0,1097	439	300	75	375
	BG	0,0872	349	200	50	250
	PM	0,1609	644	600	150	750
	Ce	0,2786	1114	600	150	750
2	FC	0,0868	347	300	75	375
	BG	0,0707	283	200	50	250
	PM	0,1602	641	400	100	500
	Ce	0,2548	1019	600	150	750

### 4.3 Podmínky analýzy

Pro účely analýzy byl použit HPLC systém P200 gradient pump (Spectra-Physics Analytical, Fremont, USA), a 7125 injection valve – 10 μl loop (Rheodyne, Cotati, USA), UV1000 detektor (Spectra-Physics Analytical, Fremont, USA) and a CSW Chromatography Station 1.5 software (DataApex, Praha, Czech republic). Systém byl vybaven kolonou IAM.PC.DD 2 (150 x 4.6 mm; 12 μm) (Regis Technologies, Morton Grove, IL). Mobilní fáze byla použita směs 24% acetonitrilu a 76% vody (v/v) obsahující 5mM oktansulfonát sodný a 5mM tetramethylamonium chlorid. Mobilní fáze se izokraticky pohybovala kolonou rychlostí toku 1 ml/min. Absorbance byla měřená v rámci UV<sub>max</sub> dané pro každý jednotlivý reaktivátor (Tab. 10.).

**Tab. 10.** Přehled vlnových délek ( $UV_{max}$ ) s maximální absorbcí pro jednotlivé reaktivátory

Název reaktivátoru	$UV_{max}$ (nm)
HI-6	308
K-027	285
K-074	290
TO-032 (trimedoxim)	292

#### 4.4 Kalibrační křivky

K vyhodnocení výsledků a získání přesných koncentrací reaktivátorů ve vzorcích byly použity dvě kalibrační křivky, jedna pro plasmy a druhá pro mozky.

##### 4.4.1 Příprava vzorků pro kalibraci – plasmy

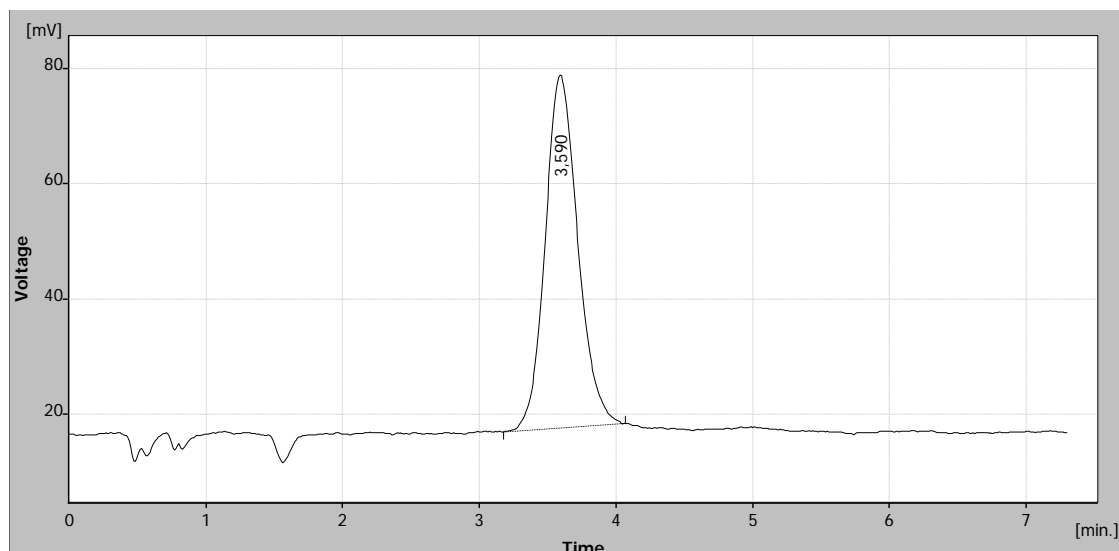
Po utracení zvířete v  $CO_2$  atmosféře byla přímo ze srdce odebrána heparinizovaná krev. Ta byla rozdělena po 250  $\mu$ l do pěti zkumavek. Ke každé bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku standardu požadované koncentrace a následně byly 1 min protřepávány na minitřepače (Lab Dancer, IKA-WERKE, Staufen, Německo). Po protřepání byla krev centrifugována 10 minut při 3.000 rpm (M-24 A, Boeco, Německo) a ke vzorkům poté přidána 30% TCA v množství  $\frac{1}{5}$  objemu plazmy, t.j. 50  $\mu$ l. Vzorky byly následně důkladně protřepány ručně a posléze též 1 min na minitřepače. Po rozmíchání byly 15 minut centrifugovány při 10.000 rpm (M-24 A, Boeco, Německo). Supernatant byl odebrán a použit pro sestavení kalibrační křivky. Výsledné koncentrace standardů byly, 50, 25, 12.5, 6.5 a 0  $\mu$ g/ml. Každý vzorek byl změřen třikrát. Analýzy probíhaly při teplotě 23°C. Pro analýzu byl použit stejný HPLC systém a stejné podmínky jako pro reálné vzorky.

##### KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO PLASMY – HI-6

Pro sestavení čtyřbodové kalibrační křivky byly zvoleny následující koncentrace 0, 6.5, 12.5, 25 a 50  $\mu$ g/ml. Výsledná kalibrační křivka je uvedena v Příloze č. 1.

Rovnice regrese byla poté spočtena jako  $y = 0,06703 \cdot x^2 + 27,9113 \cdot x$  ( $r = 0,9993447$ ).

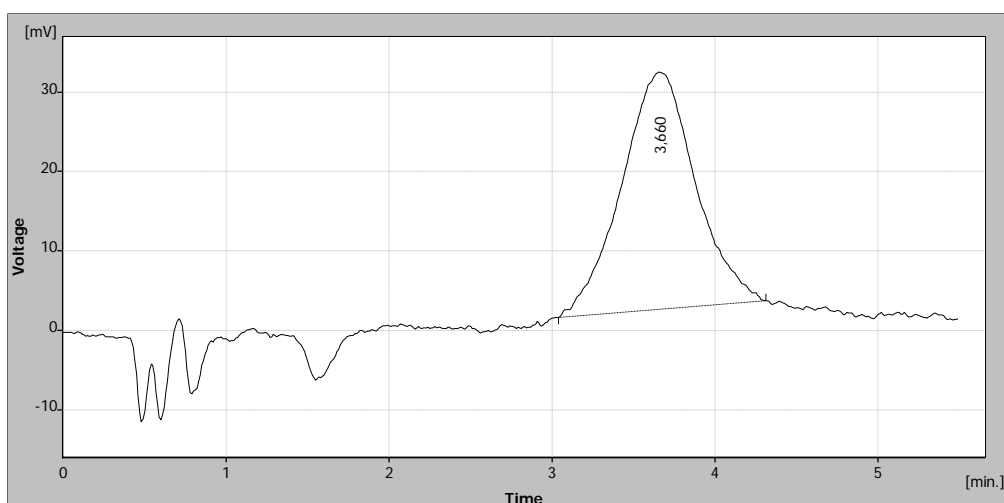
Výstupní chromatogram jednoho z bodů (25  $\mu\text{g/ml}$ ) kalibrace je uveden na Obr 33.



**Obr 33.** Výstupní chromatogram bodu kalibrační křivky - 25  $\mu\text{g/ml}$  (HI-6)

### **KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO PLASMY – K-027**

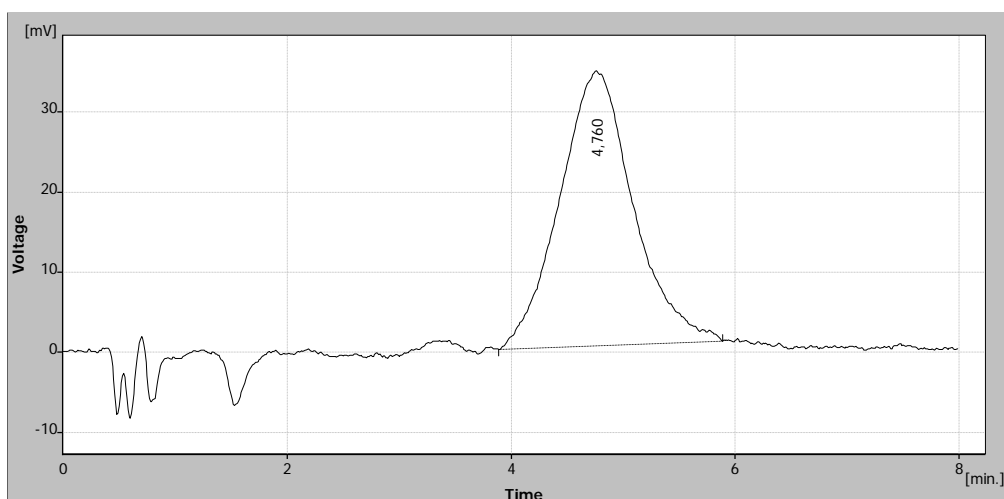
Pro sestavení čtyřbodové kalibrační křivky byly zvoleny následující koncentrace 0, 6.5, 12.5, 25 a 50  $\mu\text{g/ml}$ . Rovnice regrese byla poté spočtena jako  $y = -0,00007 \cdot x^3 + 0,05148 \cdot x^2 + 25,73502 \cdot x + 42,40442$  ( $r = 0,9994273$ ). Výstupní chromatogram jednoho z bodů (25  $\mu\text{g/ml}$ ) kalibrace je uveden na Obr 34.



**Obr 34.** Výstupní chromatogram bodu kalibrační křivky - 25 µg/ml (K-027)

### KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO PLASMY – K-074

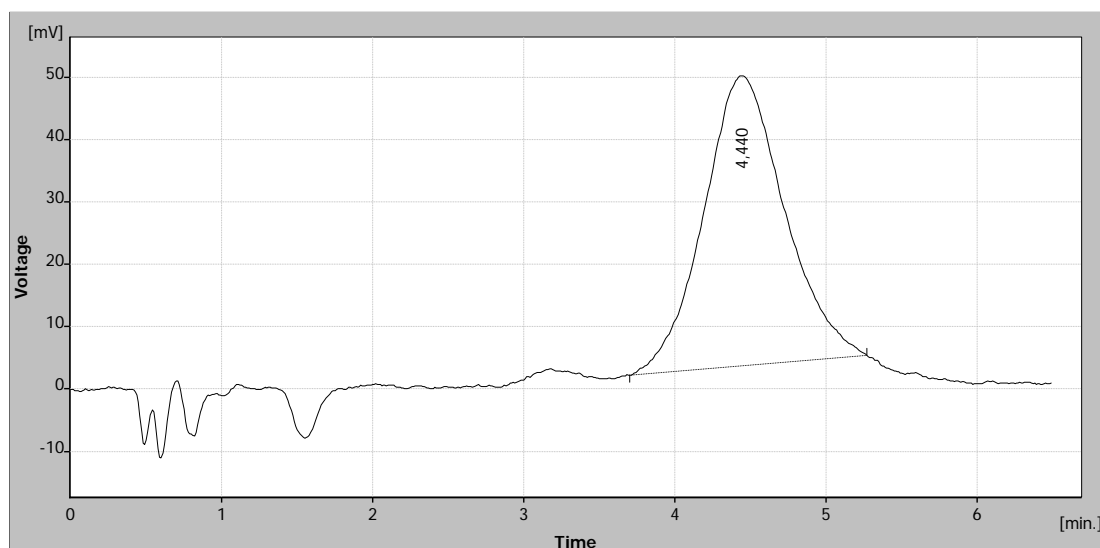
Pro sestavení čtyřbodové kalibrační křivky byly zvoleny následující koncentrace 0, 6.5, 12.5, 25 a 50 µg/ml. Rovnice regrese byla poté spočtena jako  $y = 0,1138 \cdot x^2 + 39,85342 \cdot x$  ( $r = 0,9999492$ ). Výstupní chromatogram jednoho z bodů (25 µg/ml) kalibrace je uveden na Obr 35.



**Obr 35.** Výstupní chromatogram bodu kalibrační křivky - 25 µg/ml (K-074)

## KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO PLASMY – TO-032

Pro sestavení čtyřbodové kalibrační křivky byly zvoleny následující koncentrace 0, 6.5, 12.5, 25 a 50 µg/ml. Rovnice regrese byla poté spočtena jako  $y = 0,09552 \cdot x^2 + 51,23034 \cdot x$  ( $r = 0,9993096$ ). Výstupní chromatogram jednoho z bodů (25 µg/ml) kalibrace je uveden na Obr 36.



**Obr 36.** Výstupní chromatogram bodu kalibrační křivky - 25 µg/ml (TO-032)

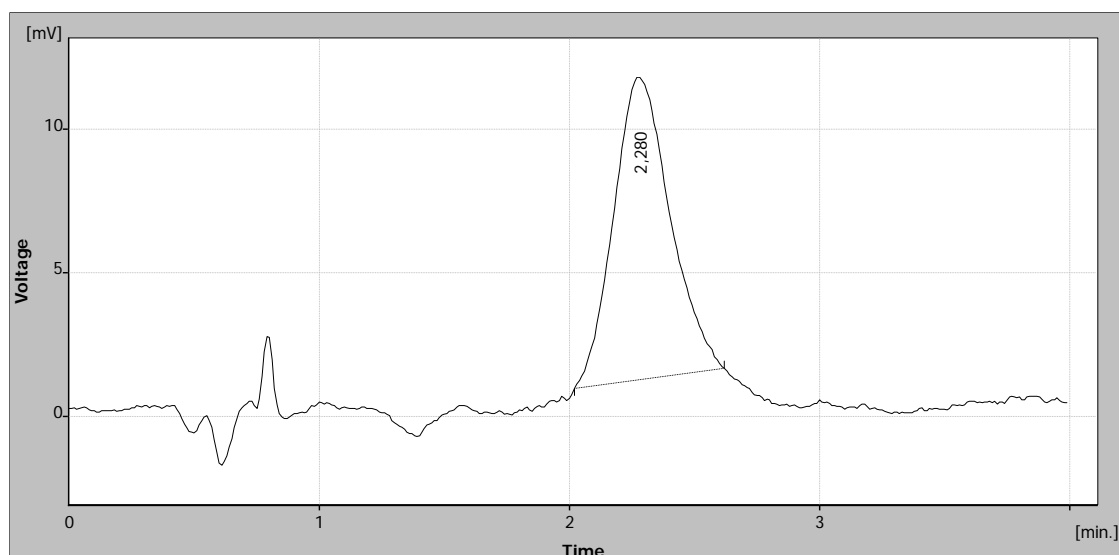
### 4.4.2 Příprava vzorků pro kalibraci – mozek

Mozková tkáň byla homogenizována (T25 Ultra-Turrax, IKA, Německo) s destilovanou vodou v poměru 1:4 (w/v). Homogenát byl rozdělen po 350 µl do pěti zkumavek. Ke každé bylo přidáno 50 µl roztoku standardu požadované koncentrace a následně byly 1 min protřepávány na minitřepačce (Lab Dancer, IKA-WERKE, Staufen, Německo). Po protřepání byla ke vzorkům přidána 20% TCA v množství  $\frac{1}{4}$  objemu homogenátu, t.j. 100 µl. Vzorky byly následně důkladně protřepány ručně a posléze též 1 min na minitřepačce. Po rozmíchání byly 15 minut centrifugovány při 10.000 rpm. Supernatant byl odebrán a použit pro sestavení kalibrační křivky. Výsledné koncentrace standardů byly 50, 25, 12.5, 6.25 a 0 µg/ml. Každý vzorek byl změřen třikrát. Analýzy probíhaly

při teplotě 23°C. Pro analýzu byl použit stejný HPLC systém a stejné podmínky jako pro reálné vzorky.

### **KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO MOZEK – HI-6**

Pro sestavení čtyřbodové kalibrační křivky byly zvoleny následující koncentrace 0, 6.5, 12.5, 25 a 50 µg/ml. Výsledná kalibrační křivka je uvedena v Příloze č. 2. Rovnice regrese byla poté spočtena jako  $y = 12,41597 * x - 2,17392$  ( $r = 0,9990027$ ). Výstupní chromatogram jednoho z bodů (6.25 µg/ml) kalibrace je uveden na Obr 37.



**Obr 37.** Výstupní chromatogram bodu kalibrační křivky – 6.25 µg/ml (HI-6)

### **4.5 Základní metody statistického zpracování**

Vzhledem k tomu, že se experiment zabýval velmi nesourodým statistickým souborem, byly pro základní statistické vyhodnocení použity pouze aritmetický průměr, v rámci jednotlivých skupin (např. HI-6, plasma, vzorek č. 1) a směrodatná odchylka také v rámci jednotlivých skupin.



## 5. VÝSLEDKY

V rámci tohoto experimentu byly vyhodnocovány koncentrace čtyřech známých reaktivátorů v plasmě a mozku. V mozku byly sledovány koncentrace ve čtyřech jeho částech – FC, BG, PM a Ce. Výsledky jsou rozděleny podle jednotlivých reaktivátorů.

### 5.1 Výsledky stanovení HI-6

#### 5.1.1 Výsledky stanovení HI-6 v plasmě

Původní dávka tohoto reaktivátoru, tedy 5% LD<sub>50</sub> (terapeutická dávka) byla 39.0 mg/kg. Analýze bylo podrobena pět vzorků plasmy. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 11 a 12. Retenční čas tohoto reaktivátoru v plasmě byl 3,3 až 3,5 minut (Obr 38).

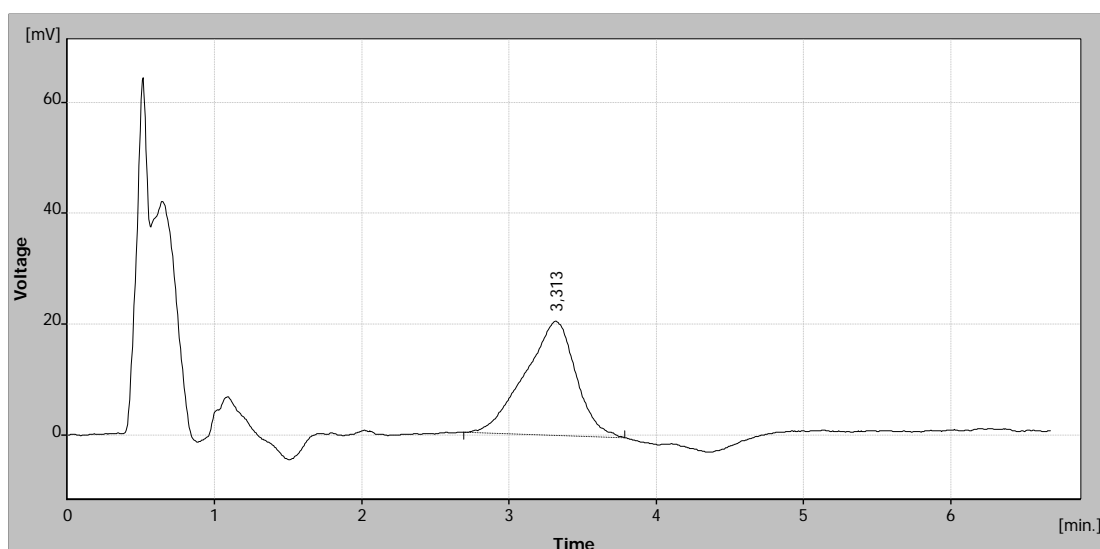
**Tab. 11.** Výstupní plochy pod píkem

Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
HI-6	1	221,111	222,553	218,715	<b>220,793</b>	1,39
	2	386,838	431,453	457,725	<b>425,339</b>	25,67
	3	542,726	495,165	491,849	<b>509,913</b>	21,88
	4	481,292	494,126	537,917	<b>504,445</b>	22,31
	5	188,674	136,720	162,169	<b>162,521</b>	17,44

**Tab. 12.** Koncentrace HI-6 ve vzorcích plasmy ( $\mu\text{g/ml}$ )

Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>HI-6</b>	1	7,777	7,826	7,694	<b>7,766</b>	0,05
	2	13,427	14,923	15,757	<b>14,702</b>	0,85
	3	18,613	16,967	16,933	<b>17,504</b>	0,74
	4	16,583	17,033	18,455	<b>17,357</b>	0,73
	5	6,632	4,842	5,731	<b>5,735</b>	0,60

Průměrná koncentrace ve všech pěti vzorcích plasmy **12,6128  $\mu\text{g/ml}$** .



**Obr 38.** Výstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku plasmy č. 4, druhý nástřik

### 5.1.2 Výsledky stanovení HI-6 v mozku

Původní dávka tohoto reaktivátoru, tedy 5% LD<sub>50</sub> (terapeutická dávka) byla 39.0 mg/kg. Analýze bylo podrobena pět vzorků plasmy. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 11 a 12. Retenční čas tohoto reaktivátoru v plasmě byl 3,3 až 3,5 minut (Obr 38).

## FRONTÁLNÍ KÚRA (FC)

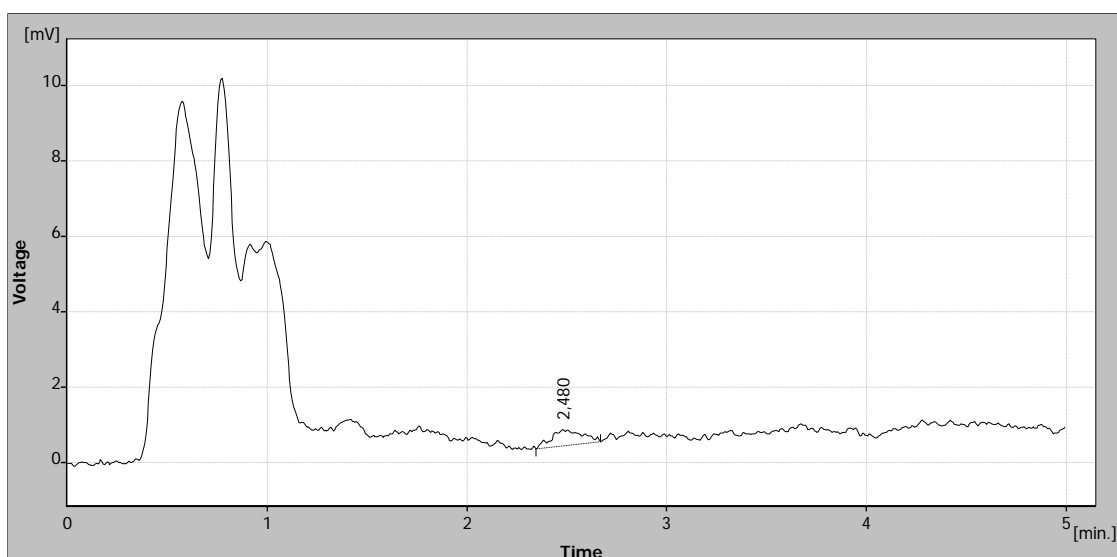
Výsledky stanovení HI-6 v FC jsou uvedeny v tabulkách 13 a 14. Retenční časy v této části mozku byly 2,480 minuty (Obr 39).

**Tab. 13.** Výstupní plochy pod píkem

Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
HI-6	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	4,548	0	0	4,548	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0

**Tab. 14.** Koncentrace HI-6 ve vzorcích FC mozků ( $\mu\text{g/ml}$ )

Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
HI-6	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0,541	0	0	0,541	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0



**Obr 39.** Výstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku FC mozku č. 3, první nástřik

### BAZÁLNÍ GANGLIA (BG)

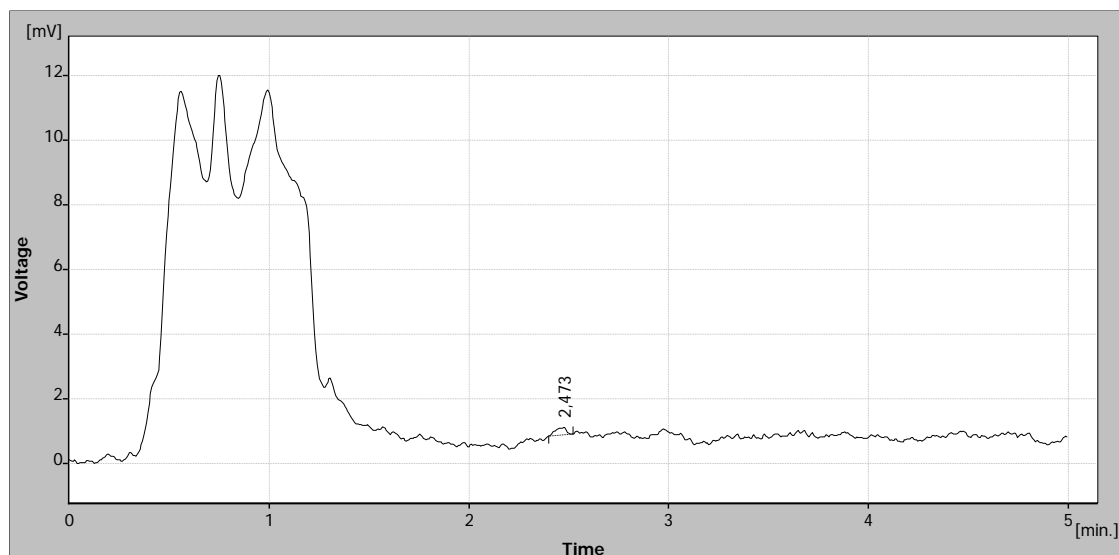
Výsledky stanovení HI-6 v BG jsou uvedeny v tabulkách 15 a 16. Retenční časy v této části mozku byly 2,473 (Obr 40), 2,413 (Obr 41), 2,427 (Obr 42) a 2,440 minuty (Obr 43).

**Tab. 15.** Výstupní plochy pod píkem

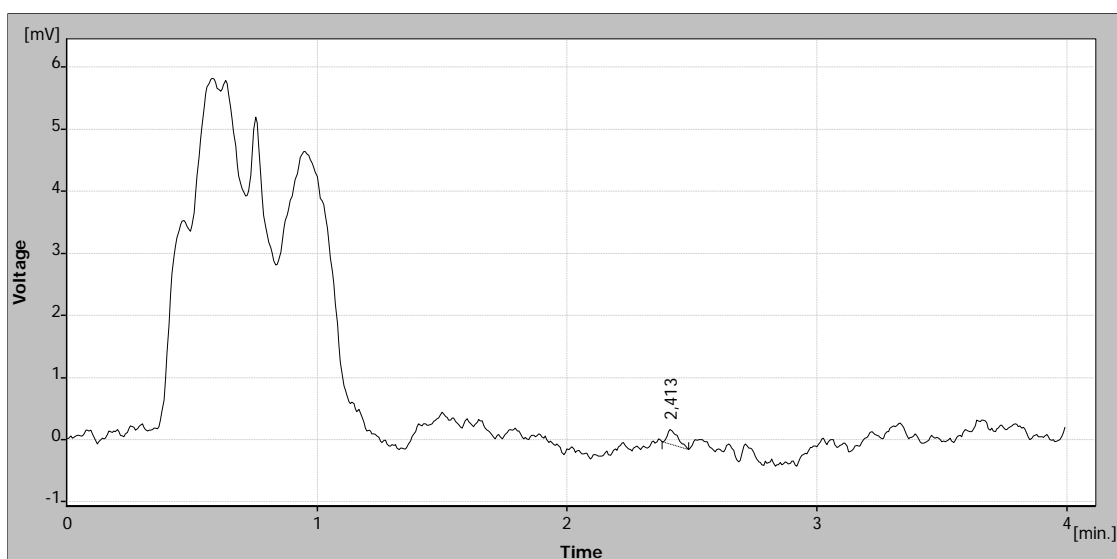
Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>HI-6</b>	1	0	0	0,930	<b>0,930</b>	0
	2	0	0	0	<b>0</b>	0
	3	0	0	0	<b>0</b>	0
	4	0,730	1,130	0,556	<b>0,805</b>	0,22
	5	0	0	0	<b>0</b>	0

**Tab. 16.** Koncentrace HI-6 ve vzorcích BG mozků ( $\mu\text{g/ml}$ )

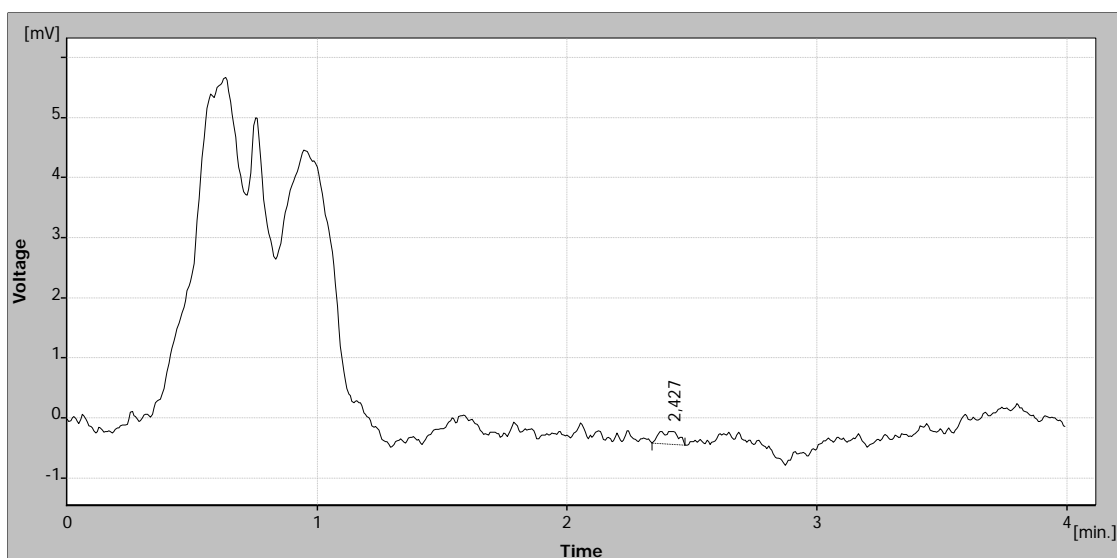
Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>HI-6</b>	1	0	0	0,250	<b>0,250</b>	0,11
	2	0	0	0	<b>0</b>	0
	3	0	0	0	<b>0</b>	0
	4	0,234	0,266	0,220	<b>0,240</b>	0,02
	5	0	0	0	<b>0</b>	0



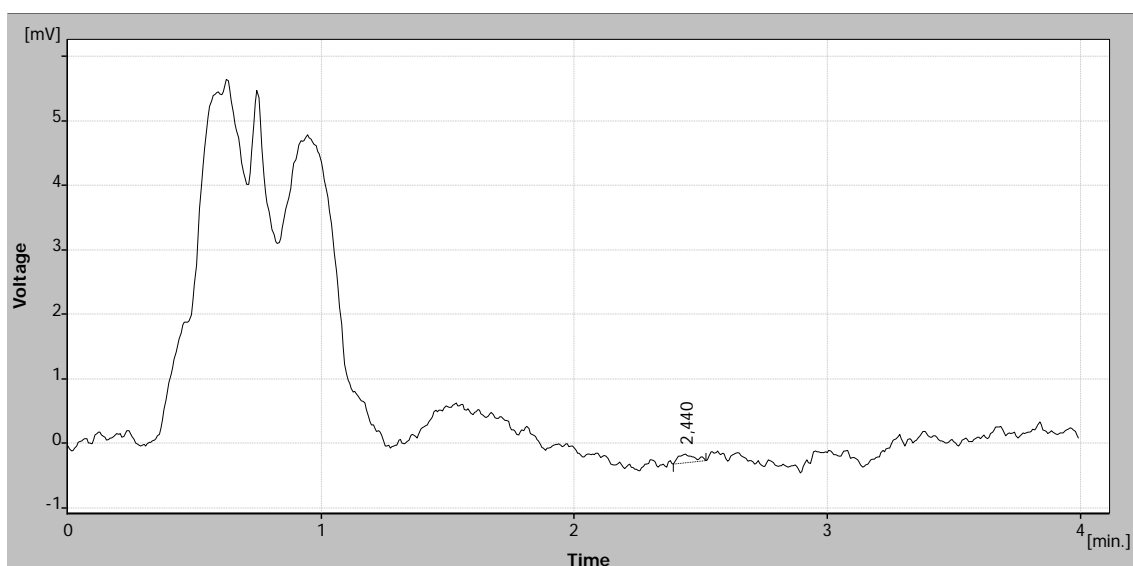
**Obr 40.** Výstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku BG mozku č. 1, třetí nástřik



**Obr 41.** Výstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku BG mozku č. 4, první nástřik



**Obr 42.** Výstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku BG mozku č. 4, druhý nástřik



**Obr 43.** Výstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku BG mozku č. 4, třetí nástřik

### PONTOMEDULÁRNÍ OBLAST (PM)

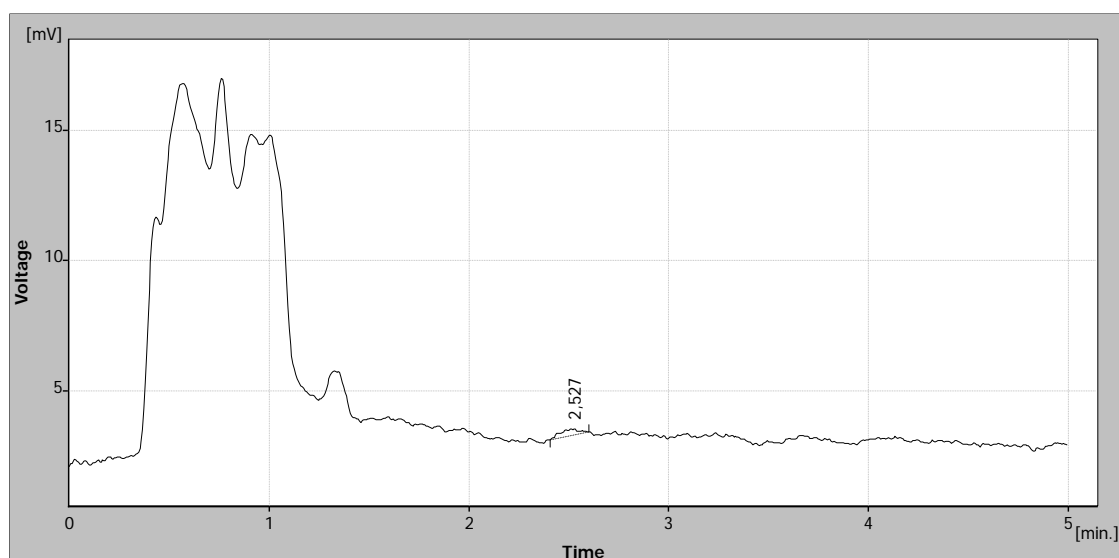
Výsledky stanovení HI-6 v PM jsou uvedeny v tabulkách 17 a 18. Retenční časy v této části mozku byly mezi 2,3 až 2,48 minut (Obr 44 – 46).

**Tab. 17.** Výstupní plochy pod píkem

Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>HI-6</b>	1	1,562	4,492	3,536	<b>3,197</b>	1,09
	2	0	0	0	<b>0</b>	0
	3	0	0	0,852	<b>0,852</b>	0
	4	1,603	0,796	1,122	<b>1,174</b>	0,29
	5	1,566	0,739	0,659	<b>0,988</b>	0,39

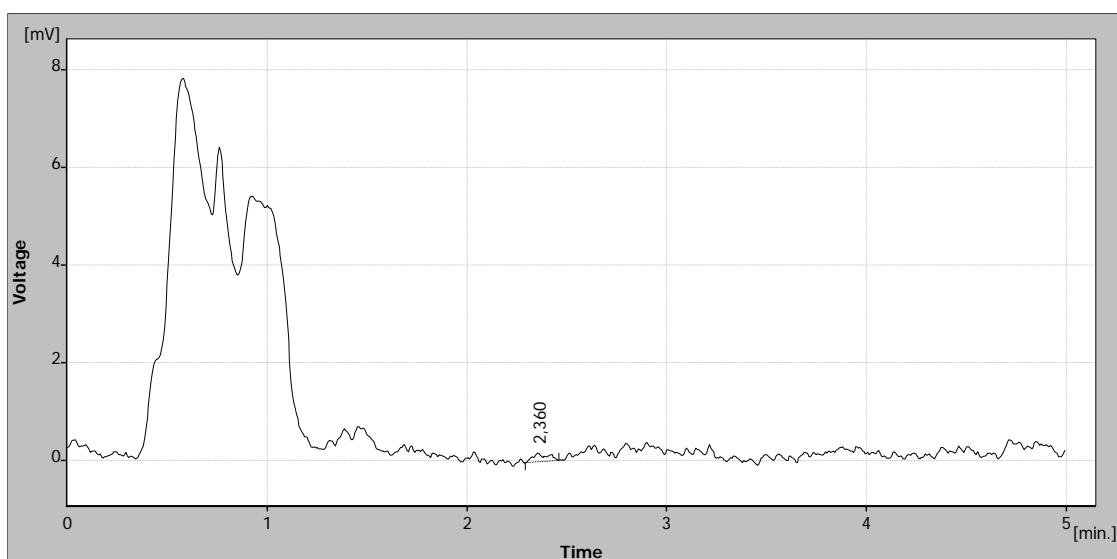
**Tab. 18.** Koncentrace HI-6 ve vzorcích PM mozků ( $\mu\text{g/ml}$ )

Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>HI-6</b>	1	0,301	0,537	0,320	<b>0,386</b>	0,10
	2	0	0	0	<b>0</b>	0
	3	0	0	0,244	<b>0,244</b>	0
	4	0,304	0,239	0,265	<b>0,269</b>	0,02
	5	0,301	0,235	0,228	<b>0,255</b>	0,03

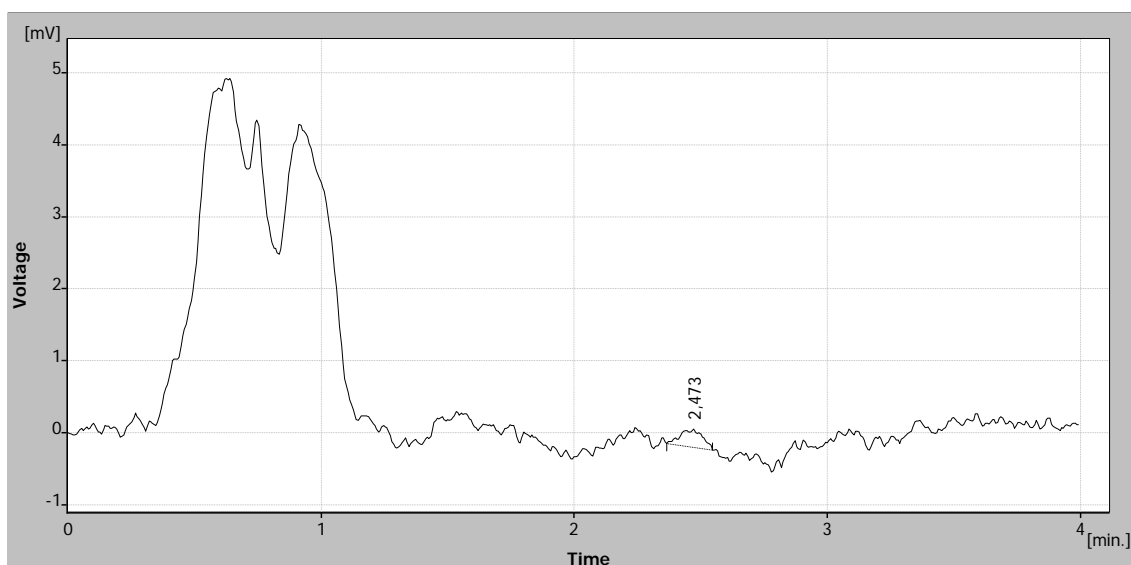


**Obr 44.** ýstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku PM mozku č. 1, první nástřik





**Obr 45.** Výstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku PM mozku č. 3, třetí nástřik



**Obr 46.** Výstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku PM mozku č. 5, první nástřik

## CEREBELLUM (Ce)

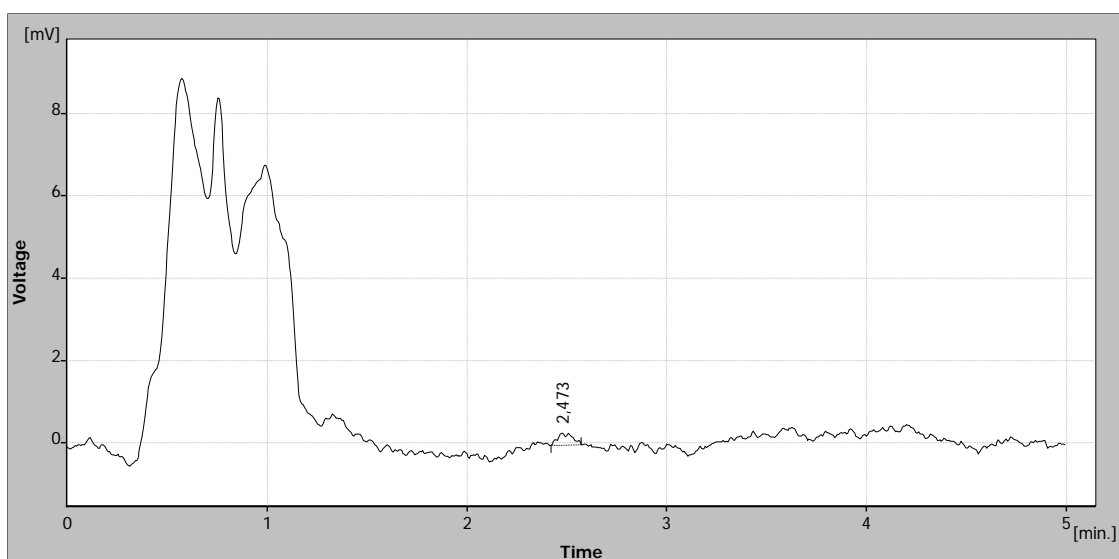
Výsledky stanovení HI-6 v PM jsou uvedeny v tabulkách 19 a 20. Retenční časy v této části mozku byly 2,473, 2,387 a 2,433 minuty (Obr 47, 48 a 49)

**Tab. 19.** Výstupní plochy pod píkem

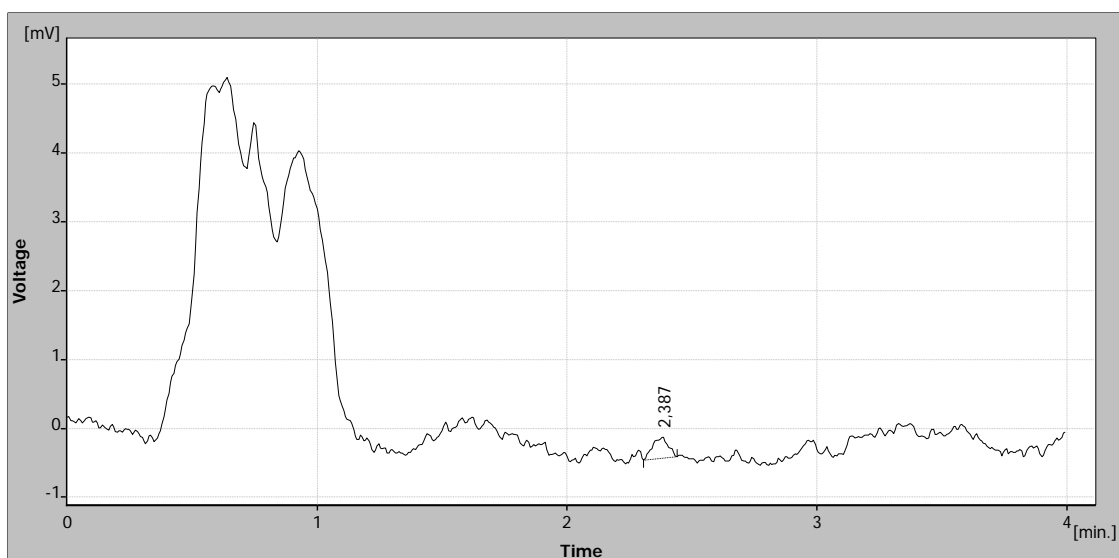
Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>HI-6</b>	1	0	0	0	<b>0</b>	0
	2	0	1,604	0	<b>1,604</b>	0
	3	0	0	0	<b>0</b>	0
	4	0	0	0	<b>0</b>	0
	5	1,358	0,352	0	<b>0,570</b>	0,53

**Tab. 20.** Koncentrace HI-6 ve vzorcích Ce mozků (µg/ml)

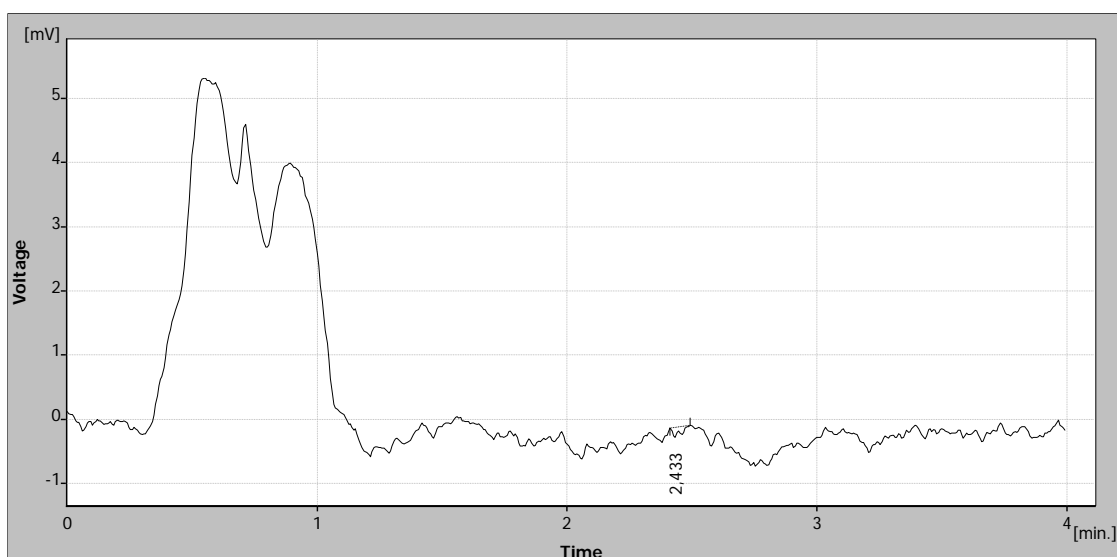
Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>HI-6</b>	1	0	0	0	<b>0</b>	0
	2	0	0,304	0	<b>0,304</b>	0
	3	0	0	0	<b>0</b>	0
	4	0	0	0	<b>0</b>	0
	5	0,284	0,203	0	<b>0,162</b>	0,11



**Obr 47.** Výstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku Ce mozku č. 2, druhý nástřik



**Obr 48.** Výstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku Ce mozku č. 5, první nástřik



**Obr 49.** Výstupní chromatogram pro stanovení HI-6 ve vzorku Ce mozku č. 5, druhý nástřik

### 5.1.3 Shrnutí výsledků stanovení HI-6 v plasmě a mozku

Tabulka 21 shrnuje výsledky stanovení HI-6 v plasmě a mozku. Dále je proveden přepočít poměrů koncentrací v jednotlivých částech mozku vůči koncentraci v plasmě.

**Tab. 21.** Shrnutí výsledků stanovení HI-6 v plasmě a mozku (průměrná koncentrace HI-6 v plasmě a v jednotlivých částech mozku)

Typ vzorku	Průměrná koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	Poměr koncentrace a koncentrace v plasmě (%)
Plasma	12,6128	100
FC	0,541	4,29
BG	0,245	1,9
PM	0,2885	2,3
Ce	0,233	1,85
Celý mozek	0,327	2,59

## 5.2 Výsledky stanovení K-027

### 5.2.1 Výsledky stanovení K-027 v plasmě

Vzhledem k tomu, že tento reaktivátor nebyl v mozku vůbec detekován, byly provedeny pouze analýzy plasmy na přítomnost tohoto reaktivátoru. Původní dávka tohoto reaktivátoru, tedy 5% LD<sub>50</sub> (terapeutická dávka) byla 22.3 mg/kg. Analýze bylo podrobena pět vzorků plasmy. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 22 a 23. Retenční čas tohoto reaktivátoru v plasmě byl 3,567 minuty (Obr 50).

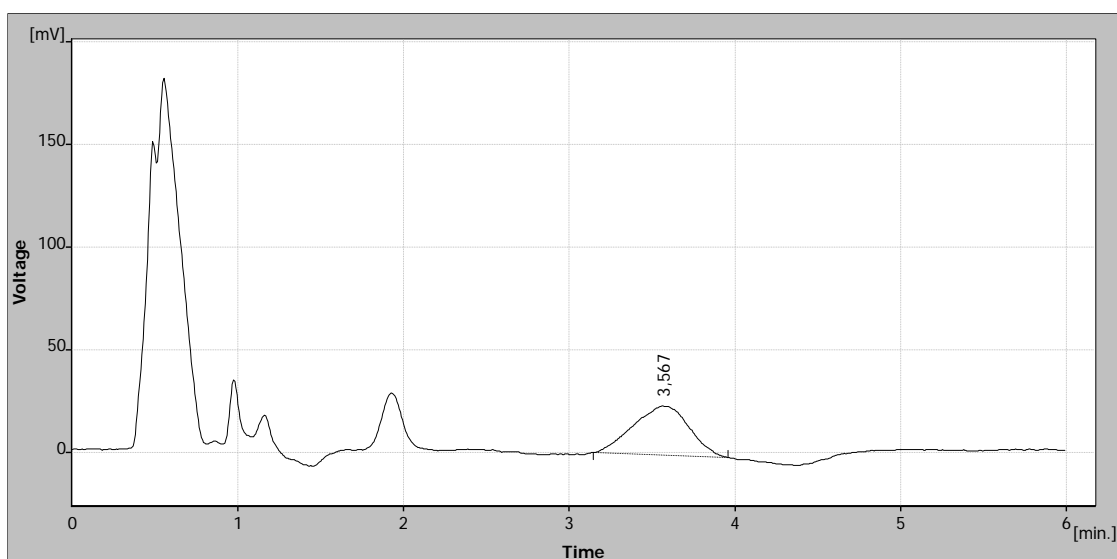
**Tab. 22.** Výstupní plochy pod píkem

Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>K-027</b>	1	712,466	780,805	682,717	<b>725,329</b>	36,98
	2	643,495	598,924	601,115	<b>614,511</b>	19,32
	3	598,032	618,512	620,951	<b>612,498</b>	9,64
	4	632,301	648,218	632,186	<b>637,569</b>	7,10
	5	692,969	711,065	692,025	<b>698,686</b>	8,25

**Tab. 23.** Koncentrace K-027 ve vzorcích plasmy (µg/ml)

Reaktivátor	Vzorek č.	První nástřik	Druhý nástřik	Třetí nástřik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>K-027</b>	1	23,202	23,332	18,817	<b>21,784</b>	1,98
	2	20,031	18,087	18,952	<b>19,023</b>	0,67
	3	18,275	19,159	18,160	<b>18,531</b>	0,42
	4	19,297	18,702	20,400	<b>19,466</b>	0,62
	5	22,745	22,787	22,909	<b>22,814</b>	0,06

Průměrná koncentrace ve všech pěti vzorcích plasmy **20,3236 µg/ml**.



**Obr 50.** Výstupní chromatogram pro stanovení K-027 ve vzorku plasmy č. 4, první nástřik

### **5.3 Výsledky stanovení K-074**

#### **5.3.1 Výsledky stanovené K-074 v plasmě**

Vzhledem k tomu, že tento reaktivátor nebyl v mozku vůbec detekován, byly provedeny pouze analýzy plasmy na přítomnost tohoto reaktivátoru. Původní dávka tohoto reaktivátoru, tedy 5% LD<sub>50</sub> (terapeutická dávka) byla 23.0 mg/kg. Analýze bylo podrobena pět vzorků plasmy. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 24 a 25. Retenční čas tohoto reaktivátoru v plasmě byl 4,6 minuty (Obr 51).

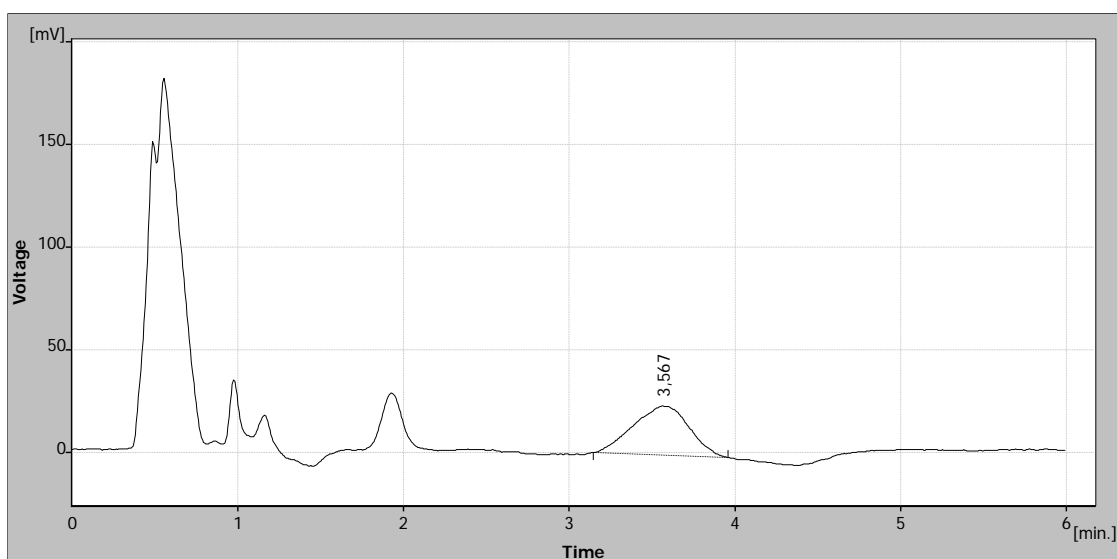
**Tab. 24.** Výstupní plochy pod píkem

Reaktivátor	Vzorek č.	První nášťik	Druhý nášťik	Třetí nášťik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>K-074</b>	1	781,676	765,502	742,943	<b>763,374</b>	13,62
	2	836,982	816,252	789,704	<b>814,313</b>	16,41
	3	858,685	734,293	836,207	<b>809,728</b>	50,29
	4	862,929	761,034	818,158	<b>814,040</b>	35,34
	5	851,409	830,339	729,555	<b>803,768</b>	49,48

**Tab. 25.** Koncentrace K-074 ve vzorcích plasmy ( $\mu\text{g/ml}$ )

Reaktivátor	Vzorek č.	První nášťik	Druhý nášťik	Třetí nášťik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>K-074</b>	1	18,623	18,256	17,743	<b>18,207</b>	0,31
	2	19,316	19,406	18,805	<b>19,176</b>	0,25
	3	20,362	17,546	19,856	<b>19,255</b>	1,14
	4	19,530	18,155	19,449	<b>19,045</b>	0,59
	5	20,199	19,724	17,438	<b>19,120</b>	1,12

Průměrná koncentrace ve všech pěti vzorcích plasmy **18,9606  $\mu\text{g/ml}$** .



**Obr 51.** Výstupní chromatogram pro stanovení K-074 ve vzorku plasmy č. 4, první nástřik

## 5.4 Výsledky stanovení TO-032

### 5.4.1 Výsledky stanovení TO-032 v plasmě

Vzhledem k tomu, že tento reaktivátor nebyl v mozku vůbec detekován, byly provedeny pouze analýzy plasmy na přítomnost tohoto reaktivátoru. Původní dávka tohoto reaktivátoru, tedy 5% LD<sub>50</sub> (terapeutická dávka) byla 7.5 mg/kg. Analýze bylo podrobena pět vzorků plasmy. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 26 a 27. Retenční čas tohoto reaktivátoru v plasmě byl 4,680 minuty (Obr 52).



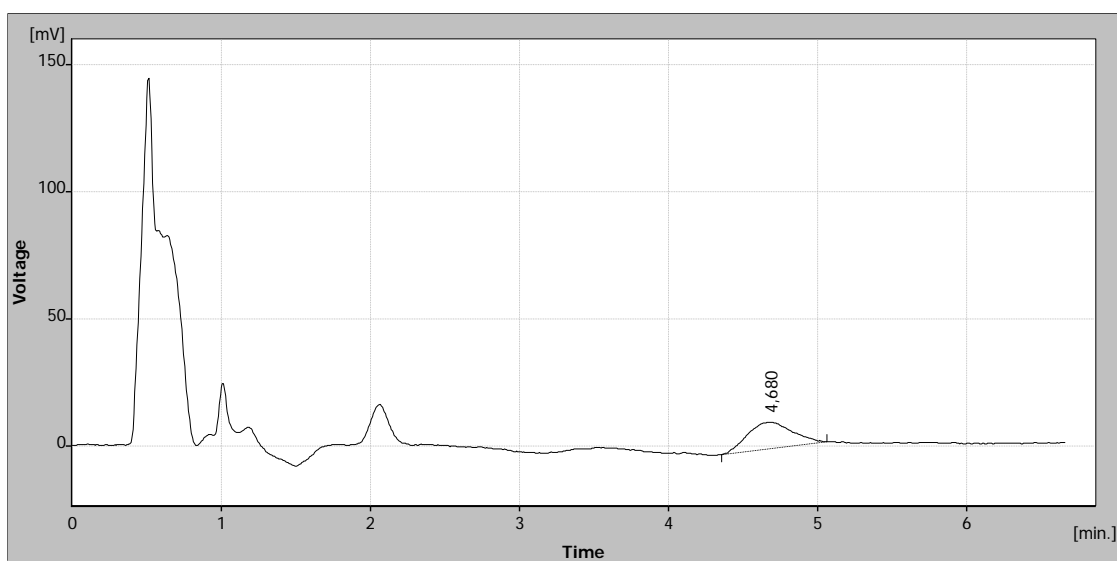
**Tab. 26.** Výstupní plochy pod píkem

Reaktivátor	Vzorek č.	První nášťik	Druhý nášťik	Třetí nášťik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>TO-032</b>	1	256,893	252,699	238,406	<b>249,333</b>	7,28
	2	238,049	208,937	205,142	<b>217,376</b>	13,78
	3	264,234	233,723	203,045	<b>233,667</b>	20,41
	4	230,459	213,867	189,906	<b>211,411</b>	14,34
	5	224,012	218,723	219,484	<b>220,740</b>	2,18

**Tab. 27.** Koncentrace TO-032 ve vzorcích plasmy (µg/ml)

Reaktivátor	Vzorek č.	První nášťik	Druhý nášťik	Třetí nášťik	Průměr	Směrodatná odchylka
<b>TO-032</b>	1	4,968	4,888	4,614	<b>4,823</b>	0,14
	2	4,607	4,048	3,975	<b>4,210</b>	0,26
	3	5,109	4,524	3,935	<b>4,523</b>	0,39
	4	4,461	4,143	3,682	<b>4,095</b>	0,28
	5	4,338	4,236	4,251	<b>4,275</b>	0,04

Průměrná koncentrace ve všech pěti vzorcích plasmy **4,3852 µg/ml**.



**Obr 52.** Výstupní chromatogram pro stanovení TO-032 ve vzorku plasmu č. 5, třetí nástřik

## 6. DISKUZE

Cílem práce bylo stanovení prostupů čtyř vybraných reaktivátorů AChE do centrálního nervového systému v různých biologických vzorcích. Byly vybrány následující oximové reaktivátory: HI-6, K-027, K-074 a TO-032. Stanovení byla prováděna ve vzorcích plasmy a mozku. Tím byl naplněn cíl práce. Hypotéza byla stanovena: „Oximy mohou prostupovat přes hematoencefalickou bariéru i při aplikaci terapeutických dávek. Ta byla potvrzena pouze částečně.

Vzhledem k tomu, že kromě HI-6 nebyl žádný jiný reaktivátor detekován, nemohla být hypotéza potvrzena úplně. Jednou z možných vysvětlení tohoto faktu je nedostatečná citlivost detektoru UV/VIS. Ten je sice pro běžné rutinní stanovení reaktivátorů v plasmě dostačující (3, 4), nicméně pro tak malé dávky v mozku, jako jsou 5% LD<sub>50</sub> (terapeutické dávky), je detektor UV/VIS pro stanovení reaktivátorů v mozku nedostačující. Vhodnějším detekčním zařízením z hlediska citlivosti by mohl být elektrochemický detektor (ECD) nebo detektor ELSD. Dalším možným vysvětlením může být aplikace neekvimolárních, ale terapeutických dávek. Ty byly stanoveny pro jednotlivé reaktivátory na základě jejich toxicit v předcházejících pokusech. HI-6 je nejméně toxická, proto je i tato dávka ze všech nejvyšší (viz Tab.2). Vzhledem k tomu, že množství aplikované HI-6 je nejvyšší ze všech reaktivátorů, vzniká v plasmě nejvyšší koncentrace a tím na základě jednoduchého principu koncentračního gradientu, je možno v CNS dosáhnout vyšších hladin, které jsou na hranici detekovatelnosti.. Všechny ostatní zvolené reaktivátory jsou pod limitem detekce pro daný UV/VIS detektor.

Stanovení pomocí ECD je poněkud komplikovanější při stávající metodice zpracování vzorků, jelikož je detektor zahlcen proteiny a fosfolipidy, které je nutné ze vzorku eliminovat. Hydrolýzu fosfolipidů proteinů lze docílit dvěma způsoby. Jedním je kyselá hydrolýza pomocí nějaké silné organické kyseliny, např. tetrachlóroctové kyseliny (20% TCA) (2, 3, 4). Tento úkon je však i součástí metodiky této práce a není

dostatečně účinný pro všechny typy fosfolipidů a proteinů. Další možností je slabě alkalická hydrolyza (1). Ta se provádí pomocí hydroxidu sodného nastavením pH na hladinu kolem 7. Tím dojde k rozbourání fosfolipidů. Problémem je, že NaOH hydrolyzuje i oximy a tím dochází ke snižování jejich koncentrace ve vzorku v průběhu času. Je tedy nutné metodiku stanovení s ECD detekcí upravit pro účely analýzy. Problémem je, že i při vylepšení metodiky dochází k částečnému zahlcení detektoru a následnému ztížení vyhodnocování výsledků (41).

Použití ELSD detektoru je také velice odlišné od naší metodiky, a to z hlediska náročnosti podmínek a instrumentace. Pokud bychom použili stejnou metodiku, resp. stejnou mobilní fázi (oktansulfonát sodný - OSA), detektor by se zahltil tímto iontově párovým činidlem. ELSD totiž pracuje na principu odpaření mobilní fáze a tím absolutní degradaci jakýchkoliv balastních látek pro analýzu a vyhodnocuje pak pouze analyzovanou látku. OSA však není možné v tomto detektoru zplynit a degradovat a dochází k nežádoucímu ovlivňování samotné analýzy. Detektor se zahltlí a trvá mu pak velice dlouho než se navrátí do původní kondice. Pro analýzy s ELSD se používají jiné mobilní fáze, které však neobsahují iontově párová činidla, která jsou nezbytná pro posunutí retenčních časů stanovovaných reaktivátorů.

Zásadním bodem vývoje metodiky analýzy reaktivátorů v biologických vzorcích, jako je plasma a mozek, je oddělení píků stanovovaných látek od píků proteinů a fosfolipidů. Jednou z možností je samotná hydrolyza těchto balastních látek (viz výše). Tato byla zavedena i do naší metodiky a to pomocí 20% TCA. Kyselá hydrolyza je jednou z mála možností, jak docílit alespoň minimální eliminace balastů. Jak již bylo zmíněno výše, alkalická hydrolyza nepřipadá v úvahu, vzhledem k tomu, že této hydrolyze podléhají i samotné reaktivátory. Proto jsou do mobilní fáze přidávána právě iontově párová činidla (viz kapitola 2.4.3), která posouvají retenční časy. Čím vyšší je koncentrace iontově párového činidla, tím déle se analyzovaná látka v koloně zadržuje. Potom docílíme striktního oddělení píků reaktivátorů od píků proteinů a fosfolipidů. To je při analýze biologických vzorků metodou HPLC zásadní a nepostradatelné.

Podle současných znalostí není možné, aby polární hydrofilní látky prostoupila přes HEB. Pokud se podíváme na výsledky této práce, tak ty tuto teorii jednoznačně vyvracejí. Oximy, neboli enzymatické reaktivátory, mají polární molekulu, a to díky tomu, že mají na pyridinovém jádře kvartérní, kladně nabitý dusík. Před takovým typem molekuly by měl být mozek chráněn právě HEB. Tato práce dokazuje, že i při terapeutických dávkách, oximy přes HEB prostupují.

Podle výsledků prostupuje HEB pouze HI-6, nicméně v našem případě nebyly dávky reaktivátorů ekvimolární. Pokud by byly ekvimolární, tak lze, na základě předchozích studií, předpokládat, že látky s odlišnou strukturou by přes HEB prostupovali lépe než HI-6.

Jak vychází ze získaných výsledků, tak HI-6 prostupuje HEB zhruba v poměru 2,6% vůči koncentraci v plasmě. Pokud budeme sledovat distribuci HI-6 v jednotlivých částech mozku, zjistíme, že až na FC (4,29%), kde byl detekován pouze v jednom případě, je distribuce v podstatě stejná – BG (1,9%), PM (2,3%) a Ce (1,85%). Toto vybočení by mohlo, vzhledem k počtu vzorků, u kterých byla v FC HI-6 detekovaná, přisuzováno standardní chybě a nebo anomální metabolizace v případě jednoho organismu. Zjištěné koncentrace jsou totiž velmi malé a velice nesnadno se vyhodnocuje jakákoliv chyba nebo anomálie. Nicméně se zdá, že se reaktivátor HI-6 v mozku distribuuje naprosto rovnoměrně, oproti původnímu předpokladu, kdy by v Ce nemělo být nižší množství než ostatní části mozku, PM by měla obsahovat vyšší množství reaktivátoru než v BG a FC. Jak je vidět, tak v případě HI-6 tomu tak není.

## 7. ZÁVĚR

Původní cíl, stanovit reaktivátory ve vzorcích plazmy a mozku byl naplněn jen částečně. V plazmě byly stanoveny koncentrace všech čtyřech vybraných reaktivátorů, ale v mozku byl stanoven pouze HI-6. Při porovnání s naměřenou koncentrací v plazmě bylo zjištěno, že HI-6 prostupuje HEB v poměru k plazmě přibližně 2,6%. V jednotlivých částech mozku je to pak FC – 4,29%, BG – 1,9%, PM – 2,3% a Ce – 1,85%. Z hlediska rovnoměrnosti distribuce vybočuje pouze poměr koncentrace v FC.. Závěrem je třeba říci, že oximy (reaktivátory) prostupují přes HEB, a to i navzdory své polární povaze, která je dána kvartérním dusíkem na pyrimidinovém jádře. Reaktivátory tedy prostupují HEB i při terapeutických dávkách.

## 8. LITERATURA

1. BAJGAR, J. Complex view on poisoning with nerve agents and organophosphates. *Acta Medica*. 2005, vol. 48, no. 1, s. 2 – 21
2. BAJGAR, J. Organophosphates/Nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Adv. Clin. Chem.* 2004, vol. 38, s. 151 – 216
3. BARTOŠOVÁ, L. Otravy nervově paralytickými látkami: co o nich víme? *Československá fyziologie*. 2006, vol. 55, no. 2, s. 66 – 75.
4. BOURNE, Y., KOLB, H.C., RADIC, Z., SHARPLESS, K.B., TAYLOR, E., MARCHOT, E. Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004, vol. 101, no. 6, s. 1449 – 1454.
5. BROCKERHOFF, H. Breakdown of phospholipids in mild alkaline hydrolysis. *J. Lipid Research*. 1963, vol. 4, no. 1, s. 96 – 100.
6. BUCHT, G., HAGGSTROM, B., RADIC, Z., OSTERMAN, A., HJALMARSSON, K. Residues important for folding and dimerisation of recombinant Torpedo californica acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1994, vol. 1209, no. 2, s. 265 – 273.
7. COWAN, J., SINTON, C.M., VARLEY, A.W., WIANS, F.H., MUNFORD, R.S. Gene therapy to prevent organophosphate intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001, vol. 173, no. 1, s. 1 – 6.
8. DE JONG, L.E.A., WOLFING, G.Z. Effect of 1-(AR)alkyl-2-hydroxyimino methyl-pyridium salts on reactivation and aging of acetylcholinesterase inhibited by ethyl dimethyldimethylphosphoramidocyanidate (tabun). *Biochem. Pharmacol.* 1978, vol. 27, no. 18, s. 2229 – 2235.
9. DOCTOR, B.P., SAXENA, A. Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity. *Chem Biol Interact.* 2005, vol. 157 – 158, s. 167 – 171.
10. EKSTRÖM, F.J., ÅSTROT, C., PANG, Y-P. Novel nerve-agent antidote design based crystallographic and mass spectrometric analyses of tabun-conjugated

- acetylcholinesterase in complex with antidotes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007, vol. 82, no. 3, s. 282 – 293.
11. FIAMMENGO, R., MUSÍLEK, K., JÄSCHKE, A. Efficient preparation of organic substrate-RNA conjugates via in vitro transcription. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, vol. 127, s. 9271 – 9276.
  12. GIACOBINI, E. *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. London: Martin Dunitz Ltd., 2001. ISBN 1-85317-910-8.
  13. GUPTA, A., GUPTA, R. A survey of plants for presence of cholinesterase activity. *Phytochemistry*. 1997, vol. 49, no. 5, s. 827 – 831
  14. GUPTA, A., VIJAYARAGHAVAN, M.R., GUPTA, R. The presence of cholinesterase in marine algae. *Phytochemistry*. 1998, vol. 49, no. 7, s. 1875 – 1877.
  15. GUPTA, R. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. London: Elsevier academic press, 2006. ISBN 978-0-12-088523-7.
  16. GUPTA, R.C., DETTBARN, W.D. Potential of memantine, D-tubocurarine, and atropine in preventing acute toxic myopathy induced by organophosphate nerve agents: Soman, sarin, tabun and VX. *Neurotoxicology*. 1992, vol. 13, no. 3, s. 649 – 661
  17. GYENGE, M., KALASZ, H., PETROIANU, G.A., LAUFER, R., KUČA, K., TEKES, K. Measurement of K-27, an oxime-type cholinesterase reactivator by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection from different biological samples. *J. Chromatogr. A*. 2007, vol. 1161, no. 1-2, s. 146 – 151.
  18. HAREL, M., QUINN, D.M., NAIR, H., SILMAN, I., SUSSMAN, J.L. The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, vol. 118, no. 10, s. 2340 – 2346.
  19. HARRIS, L.W., HEYL, W.C., STITCHER, D.L., BROMMFIELD, C.A. Effect of 1,1-oxydimethylene-bis-(4-tert-butylpyridinium chloride) (SAD-128) and



- decamethonium on reactivation of soman- and sarin-inhibited cholinesterase by oximes. *Biochem. Pharmacol.* 1978, vol. 27, no. 5, s. 757 – 761.
20. Hazardous Substance Data Bank <URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>> (22.4.2008)
21. HRABINOVA, M., MUSILEK, K., JUN, D., KUČA, K. New group of xylene linker-containing acetylcholinesterase reactivators as antidotes against the nerve agent cyclosarin. *J. Enzym. Inhib. Med Ch.* 2006, vol. 21, no. 5, s. 515 – 519.
22. CHAMBERLAIN, J. *The analysis of drugs in biological fluids*. 2nd Edition. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Inc., 1995. ISBN 0-8493-2492-0.
23. CHERRY, N., MACKNESS, M., DURRINGTON, P. Paraoxonase (PON1) polymorphism in farmers attributing ill health to sheep dip. *Lancet.* 2002, vol. 359, no. 9308, s. 763 – 764.
24. KATZ, E. *Handbook of HPLC*. Basel, Switzerland: Marcel Dekker AG., 1998. ISBN 0-8247-9444-3.
25. KUČA, K. Vztah mezi strukturou reaktivátorů acetylcholinesterázy a jejich reaktivací účinností. Disertační práce. Hradec Králové, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany Brno, 2005.
26. KUČA, K., CABAL, J., JUN, D., MUSILEK, K. In vitro reactivation potency of acetylcholinesterase reactivators – K074 and K075 – to reactive tabun-inhibited human brain cholinesterases. *Neurotox. Res.* 2007, vol. 11, no. 2, s. 101 – 106.
27. KUČA, K., CABAL, J., JUN, D., MUSÍLEK, K. In vitro reactivation potency of acetylcholinesterase reactivators – K074 and K075 - to reactivate tabun-inhibited human brain cholinesterase. *Neurotox. Res.* 2007, vol. 11, no. 2, s. 101 – 106.
28. KUČA, K., CABAL, J., MUSÍLEK, K., JUN, D., BAJGAR, J. Effective bisquarternary reactivators of tabun-inhibited AChE. *J. Appl. Toxicol.* 2005, vol. 25, no. 6, s. 491 – 495.
29. KUČA, K., JUN, D., MISÍLEK, K. BAJGAR, J. Reactivators of tabun-inhibited acetylcholinesterase: Structure-biological activity relationship. *Front. Drug Des. Disc.* 2007, vol. 3, no. 1, s. 381 – 394.

30. KUČA, K., JUN, D., MUSÍLEK, K. Vliv délky a tvaru spojovacího řetězce biskvartérních reaktivátorů acetylcholinesterázy na jejich schopnost reaktivovat enzym, inhibovaný sarinem. *Voj. Zdrav. Listy*. 2006, vol. 75, no. 1, s. 37 – 40.
31. KUČA, K., PATOČKA, J., CABAL, J. Reactivation of organophosphate inhibited acetylcholinesterase activity by  $\alpha,\omega$ -bis-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)alkanes in vitro. *J. Appl. Biomed.* 2003, vol. 1, no. 4, s. 207 – 211.
32. LEWIS, W.G., GREEN, L.G., GRZYNSZPAN, E., RADIC, Z., CARLIER, E.R., TAYLOR, E., FINN, M.G., SHARPLESS, K.B. Click chemistry in situ: Acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 2002, vol. 41, no. 6, s. 1053 – 1057.
33. LIM, C.K. *HPLC of small molecules: A practical approach*. Oxford, UK: IRL Press, Ltd., 1986. ISBN 0-947946-77-2.
34. LORKE, D., E., HASAN, M.Y., NURULAIN, S.M., SHEEN, R., KUČA, K., PETROIANU, G.A. Entry of two new asymmetric bispyridium oximes (K-27 and K-48) into the rat brain: comparison with obidoxime. *J. Appl. Toxicol.* 2007, vol. 27, no. 5, s. 482 – 490.
35. LUNDY, P.M., RAVEH, L., AMITAI, G. Development of the bisquaternary oxime HI-6 toward clinical use in the treatment of organophosphate nerve agent poisoning. *Toxicol. Rev.* 2006, vol. 25, no. 4, s. 231 – 243.
36. McMASTER, M.C. *HPLC, A practical user's guide*. New Jersey, USA: John Wiley & Sons Inc., 2007. ISBN 0-471-75401-3.
37. MEYER, V.R. *Pitfalls and errors of HPLC in pictures*. Weinheim, Switzerland: Wiley – VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, 2006. ISBN 3-527-31372-9.
38. MUSÍLEK, K., KUČA, K., DOHNAL, V., MAREK, J., KOLEČKÁŘ, V. Two step synthesis of a non-symmetric acetylcholinesterase reactivator. *Molecules*. 2007, vol. 12, no. 8, s. 1755 – 1761.

39. MUSÍLEK, K. Syntéza nových reaktivátorů acetylcholinesterasy a jejich evaluace proti otravám organofosfáty in vitro. Disertační práce. Hradec Králové, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK, 2007.
40. MUSILEK, K., HOLAS, O., HAMBALÉK, J., KUČA, K., JUN, D., DOHNAL, V., DOLEZAL, M. Synthesis of bispyridinium compounds bearing propane linker and evaluation of their reactivation activity against tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Lett. Org. Chem.* 2006, vol. 3, no. 11, s. 831 – 835.
41. MUSÍLEK, K., HOLAS, O., JUN, D., DOHNAL, V., GUNN-MOORE, F., OPLETALOVA, V., DOLEZAL, M., KUČA, K. Monooxime reactivators of acetylcholinesterase with (E)-but-2-ene linker – Preparation and reactivation of tabun-inhibited and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, vol. 15, no. 21, s. 6733 – 6741.
42. MUSILEK, K., HOLAS, O., KUČA, K., JUN, D., DOHNAL, V., DOLEZAL, M. Synthesis of a novel series of non-symmetrical bispyridinium compounds bearing xylene linker and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* 2007, vol. 22, no. 4, s. 425 – 432.
43. MUSILEK, K., HOLAS, O., KUČA, K., JUN, D., DOHNAL, V., DOLEZAL, M. Synthesis of asymmetrical bispyridinium compounds bearing cyano-moiety and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, vol. 16, no. 21, s. 5673 – 5676.
44. MUSILEK, K., HOLAS, O., KUČA, K., JUN, D., DOHNAL, V., OPLETALOVA, V., DOLEZAL, M. Novel series of bispyridinium compounds bearing (Z)-but-2-ene linker – Synthesis and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, vol. 17, no. 11, s. 3172 – 3176.

45. MUSILEK, K., KUČA, K., DOLEZAL, V. Progress in synthesis of new acetylcholinesterase reactivators during the period 1990 – 2004. *Curr. Org. Chem.* 2007, vol. 11, no. 2, s. 229 – 238.
46. MUSILEK, K., KUČA, K., JUN, D., DOHNAL, V., DOLEZAL, M. Synthesis of a novel series of bispyridinium compounds bearing a xylene linker and evaluation of their reactivation activity against chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 2005, vol. 20, no. 5, s. 409 – 415.
47. MUSILEK, K., KUČA, K., JUN, D., DOHNAL, V., DOLEZAL, M. Synthesis of the novel series of bispyridinium compounds bearing (E)-but-2-ene linker and evaluation of their reactivation activity against chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, vol. 16, s. 622 – 627.
48. MUSÍLEK, K., KUČA, K., JUN, D., DOHNAL, V., DOLEŽAL, M. Synthesis of a novel series of bispyridinium compounds bearing a xylene linker and evaluation of their reactivation activity against chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 2005, vol. 20 no. 5, s. 409 – 415.
49. MUSÍLEK, K., KUČA, K., JUN, D., DOHNAL, V., KIM, T-H., JUNG, Y-S., DOLEŽAL, M. Syntéza reaktivátorů fosforylované acetylcholinesterázy bispyridiniumdialdoximového typu s 3-oxapentanovým spojovacím řetězcem a jejich testování in vitro na modelu enzymu inhibovaného chlorpyrifosem a methylchlorpyrifosem. *Česká Slov. Farm.* 2006, vol. 55, no. 3, s. 115 – 119.
50. MUSILEK, K., LIPKA, L., RACA KOVA, V., KUČA, K., JUN, D., DOHNAL, V., DOLEZAL, M. New methods in synthesis of acetylcholinesterase reactivators and evaluation of their potency to reactivate cyclosarin-inhibited AChE. *Chem. Papers.* 2006, vol. 60, no. 1, s. 48 – 51.
51. OKUNO, S., SAKURADA, K., OHTA, H., IKEGAYA, H., KAZUI, Y., AKUTZU, A., TAKATORI, T., IWADATE, K. Blood-brain barrier penetration of novel pyridinealdoxime methiodide (PAM)-type oximes examined by brain

- microdialysis with LC-MS/MS. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 227, no. 1, s. 8 – 15.
52. PAAR, M., MUSILEK, K., HRABINOVÁ, M., JUN, D., KUČA, K. Optimalizace syntézy nových reaktivátorů acetylcholinesterázy – K027 a K048. *Zdrav. Voj. Farm.* 2005, vol. 15, no. 2-3, s. 18 – 23.
53. PANG, Y.P., KOLMEYER, T.M., HONG, F. LEE, J.C., HAMMOND, P.I. HAUGABOUK, S.P., BRIMIJOIN, S. Rational design of alkylene-linked bispyrimidiumaldoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. *Chemistry & Biology.* 2003, vol. 10, no. 6, s 491 – 502.
54. PARK, N.-J., JUNG, Y-S., MUSÍLEK, K., JUN, D., KUČA, K. Potency of several structurally different acetylcholinesterase reactivators to reactive house fly and bovine acetylcholinesterases inhibited by paraoxon and DFP. *B. Kor. Chem. Soc.* 2006, vol. 27, no. 9, s. 1401 – 1404.
55. PATOČKA, J. et al. *Vojenská toxikologie.* Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0608-3.
56. PATOČKA, J., CABAL, J., DOHNAL, V., KUČA, K., JUN, D. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorous ester: In vitro kinetics and thermodynamics. *J. Appl. Biomed.* 2005, vol. 3, no. 2, s. 91 – 99.
57. PATOČKA, J., JUN, D., BAJGAR, J., KUČA, K. Prophylaxis against nerve agent intoxication. *Def. Sci. J.* 2006, vol. 56, s. 775 – 784.
58. PETROIANU G. A., LORKE, D.E., HASAN, M.Y., ADEM, A., SHEEN, R., NURULAIN, S.M., KALASZ, H. Paraoxon has only a minimal effect on pralidoxime brain concentration in rats. *J. Appl. Toxicol.* 2007, vol. 27, no. 4, s. 350 – 357.
59. PHILO, J.S. Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types? *AAPS Journals.* 2006, vol. 8, no. 3, s. 564 – 571.
60. PROCHÁZKA, P. Srovnání extrakčních metod používaných při stanovení amfetaminů ve vzorcích lidských vlasů ve forenzní toxikologii. Bakalářská práce. České Budějovice, Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2006.

61. PRYMULA, R. et al. *Biologický a chemický terorizmus*. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-247-0288-6.
62. RADIC, Z., PICKERING, N.A., VELLOM, D.C., CAMP, S., TAYLOR, P. Three distinct domains in the cholinesterase inhibitors. *Biochemistry*. 1993, vol. 32, no. 45, s. 12074 – 12084.
63. ROSSOMANDO, E.F. *HPLC in enzymatic analysis*. New York, USA: John Wiley & Sons, 1998. ISBN 0-471-1040-3.
64. Rotterdam Convention on the Prior Informed Consent Procedure for Certain Hazardous Chemicals and Pesticides in International Trade. WHO, FAO, UNEP, Rotterdam, 2005. (<http://www.pic.int/>)
65. SIDELL, E.R., GROFF, W.A. The reactivability of cholinesterase inhibited by VX and sarin in man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1974, vol. 27, no. 2, s. 241 – 252.
66. SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L. *Practical HPLC method development*. 2nd Edition. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 1997. ISBN 0-471-00703-X.
67. SUSSMAN, J.L., HAREL, M., FROLOW, E., OEFNER, C., GOLDMAN, A., TOKER, L., SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. 1998, vol. 253, no. 5022, s. 872 – 879.
68. TEKES, K., HASAN, M.Y., SHEEN, R., KUČA, K., PETROIANU, G.A., LUDÁNYI, K., KALASZ, H. High-performance liquid chromatographic determination of the plasma concentration of K-27, a novel oxime type cholinesterase reactivator. *J. Chromatogr. A*. 2006, vol. 1122, no. 1-2, s. 84 – 87.
69. URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg166.html/> (24.4.2008)
70. URL: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v070pr06.htm/> (23.4.2008)
71. URL: [http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest18\\_e.htm/](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest18_e.htm/) (23.4.2008)
72. URL: <http://www.mindfully.org/Pesticide/2003/Organophosphorus-Neurotoxicity1aug03.htm/> (26.4.2008)

73. VASUDEVAN, M., PARLE, M. Pharmacological actions of *Thespesia populnea* relevant to Alzheimer's disease. *Phytomedicine*. 2006, vol. 13, no. 9-10, s. 677 – 687.
74. VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. Praha: ACADEMIA, 2002. ISBN 80-200-0600-1.
75. YOON, CH.H., KIM, S.J., SHIN, B.S., LEE, K.C., YOO, S.D. Rapid screening of blood-brain barrier penetration of drugs using the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine column chromatography. *J Boimol Screen*. 2006, vol. 11, no. 1, s. 13 – 20.

## **9. KLÍČOVÁ SLOVA**

Reaktivátory, oximy, HPLC-UV/VIS, Hematoencefalická bariéra, HI-6, K-027, K-074, TO-032



## **10. PŘÍLOHY**

**PŘÍLOHA Č. 1:** Kalibrační křivka pro HI-6 v plasmě a mozku