

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK / REVIEW ARTICLE

PROFYLAKTIKA PROTI NERVOVĚ PARALYTICKÝM LÁTKÁM

PROPHYLACTIC AGENTS IN THE MANAGEMENT OF ORGANOPHOSPHORUS INTOXICATION

Barbora Svobodová^{1,2}, Lukáš Górecki^{1,2}, Jan Korábečný^{1,2}✉

¹ Katedra toxikologie a vojenské farmacie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany v Brně, Třebešská 1575, 500 02, Hradec Králové, Česká republika

² Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

Přijato 24. června 2019.

Akceptováno 24. června 2019.

Zveřejněno 6. září 2019.

Souhrn

Nervově paralytické látky (NPL) patří mezi organofosforové inhibitory (OFI) acetylcholinesterasy (AChE). Přestože je používání vysoce toxických OFI jako chemických bojových látek zakázáno, byly tyto látky v minulosti několikrát zneužity. Z těchto důvodů je vývoj nových profylakticky účinných sloučenin a terapie intoxikací OFI stále aktuální. Podáním běžných antidot (např. oximových reaktivátorů) profylakticky se nejen zvyšuje odolnost organismu proti účinkům NPL při očekávané intoxikaci, např. při práci v zamořeném prostředí po teroristickém útoku, ale potencuje se i následná antidotní léčba po expozici. Farmakologická profylaxe se v současnosti dá rozdělit na tři směry – ochrana AChE před ireverzibilní inhibicí, profylaktické podání běžných antidot a použití tzv. bioscavengerů nebo-li "vychytávačů" OFI. Cílem předkládaného přehledového článku je poukázat na současné trendy profylaxe a zároveň nastínit vývoj nových potenciálních reverzibilních inhibitorů AChE, jako jsou např. huperzin A či akridinové deriváty.

Klíčová slova: nervově paralytické látky; profylaktická antidota; acetylcholinesterasa; takrin; huperzin A; profylaxe

Summary

Nerve agents (NAs) belong to family of organophosphorus inhibitors (OPIs) of acetylcholinesterase (AChE) enzyme. Although the use of highly toxic OPIs as chemical warfare agents is prohibited, they have been misused several times and thus still represents an emerging threat. For these reasons, the development of novel prophylactic agents and therapeutic intervention against NAs is still up-to-date and of high importance. Prophylactic administration of antidotes not only increases body's resistance to the effects of NAs, e.g. when operating at a contaminated environment after a terrorist attack, but also potentiates the subsequent antidotal therapy after exposure. Currently, pharmacological prophylaxis can be delivered either by protection of AChE against irreversible inhibition, administration of commonly used antidotes

in advance (i.e. oxime reactivators) or by the use of bioscavengers. The aim of the recent review is to highlight the current trends in prophylaxis and outline breakthroughs in prophylaxis based on reversible cholinesterase inhibitors like huperzine A or acridine derivatives.

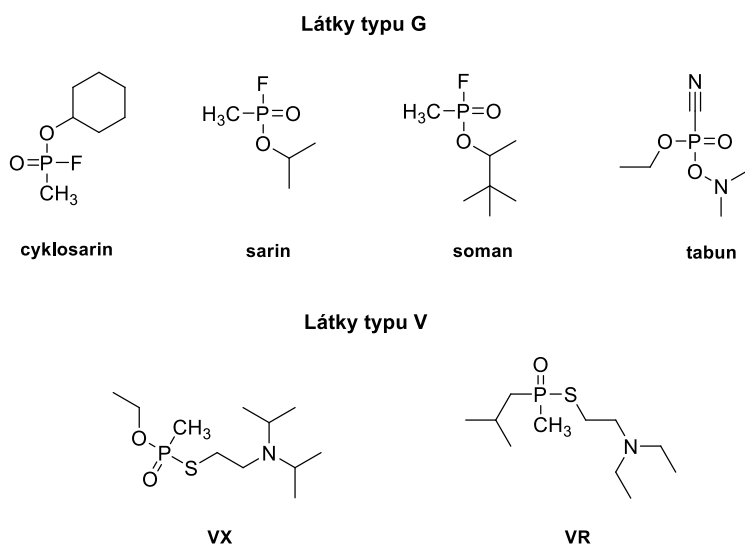
Key words: nerve agents; prophylactic antidotes; acetylcholinesterase; tacrine; huperzine A; prophylaxis

Úvod

Nervově paralytické látky (NPL) patří mezi nejnebezpečnější skupinu bojových chemických látek. Jedná se o organické sloučeniny fosforu, které prostupují do organismu všemi branami vstupu, mají rychlý nástup účinku a vysokou toxicitu. Jejich výroba je poměrně snadná i levná a jsou proto teoreticky využitelné ve vojenské oblasti nebo mohou být zneužity teroristickými buňkami (Patocka J 2004).

Počátky vývoje NPL se datují k 30. letům 20. století, kdy v nacistickém Německu v laboratořích firmy I. G. Farben pracovala skupina vedená Dr. Gerhardem Schraderem, který v rámci výzkumu nových insekticidů popsal v roce 1935 významné toxické účinky u *N,N*-dimethylamidofosorylfluoridu. Tímto objevem byla zahájena cesta k syntéze řady toxických organofosforových sloučenin. Jednalo se o tabun, sarin, soman a později látku VX (Cabal J a Bajgar J 1999; Kucera J 2004). NPL byly v minulosti opakovaně použity jak ve válečných konfliktech, tak i proti civilistům při teroristických útocích. V roce 1988, v průběhu Irácko-Iránské války, zaútočila letadla Iráku chemickými zbraněmi na kurdské městečko Halabža u hranic s Íránem. Sarin byl v tomto případě hlavní bojovou chemickou látkou (Hurnik Z a Tuma P 2001). Mezi nejznámější teroristický útok, při kterém byla zneužita NPL, patří sarinový útok v tokijském metru v roce 1995 (Pitchamnn V 1999; Prymula P 2002). V roce 2013, v průběhu občanské války v Sýrii došlo v Ghútě, na východním předměstí Damašku, k chemickému útoku, kde byl opět zneužit sarin (Pita R a Domingo J 2014). V současné době jsou striktně zakázány vývoj, výroba, skladování a použití chemických zbraní, kam patří i NPL dle mezinárodní Úmluvy o zákazu chemických zbraní, kterou k dnešnímu datu ratifikovalo celkem 192 států (Patocka J 2014).

NPL se dělí na dvě velké skupiny, které jsou obecně označovány jako G-látky a V-látky. Mezi G-látky patří tabun (GA, *O*-ethyl dimethylamidokyanofosfát), sarin (GB, *O*-isopropylmethylfluorofosfonát), cyklosarin (GF, cyclohexylmethylfluorofosfonát) a soman (GD, *O*-pinakolylmethylfluorofosfonát; Obr. 1). Jedná se o bezbarvé kapaliny bez výraznějšího zápachu, relativně rozpustné ve vodě a dobře v organických rozpouštědlech. Je pro ně



Obrázek 1. Chemické struktury látek typu G a V.

charakteristická vysoká těkavost. Zamoření terénu bez ztráty toxicity trvá 12 - 24 hodin. V-látky patří také mezi bezbarvé kapaliny bez výraznějšího zápachu, ale na rozdíl od G-látek jsou ve vodě špatně rozpustné, v organických rozpouštědlech a tucích jsou rozpustné dobře. Mají velmi nízkou těkavost a v terénu perzistují týdny až měsíce. Mezi zástupce této skupiny patří látka VX (*O*-ethyl-S-(2-diisopropyl-aminoethyl)-methylthiofosfonát) a ruský analog této látky VR (*O*-isobutyl-S-(2-diethylaminoethyl)-methylthiofosfonát; Obr. 1) (Patocka J 2004).

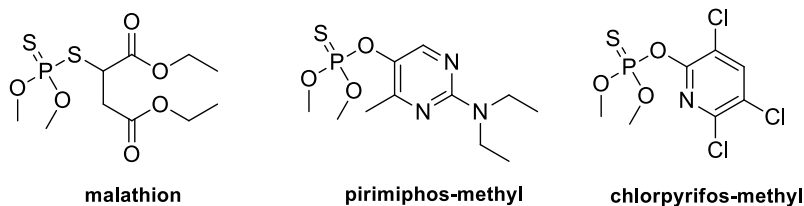
Je nutno uvést, že sloučeniny velice podobné struktury se používají v průmyslu jako změkčovadla, hydraulické kapaliny, zpomalovače hoření u elektrických zařízení, nebo ve veterinární či humánní medicíně jako léčiva (Gupta RC 2009).

Nejširšího použití dosáhly organické sloučeniny fosforu v zemědělství, jako insekticidy, které jsou běžně dostupné jako např. malathion, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos-methyl aj. (Obr. 2). Tyto látky vykazují nižší toxicitu než NPL v důsledku strukturálních rozdílů mezi hmyzí a savčí AChE (Tab. 1) (Worek F et al. 2004). K otrávám s následkem úmrtí pak většinou dochází při nešetrné manipulaci nebo při sebevražedných pokusech.

Tabulka 1. Hodnoty LD₅₀ vybraných NPL a insekticidů podané p.o. laboratorním potkanům.

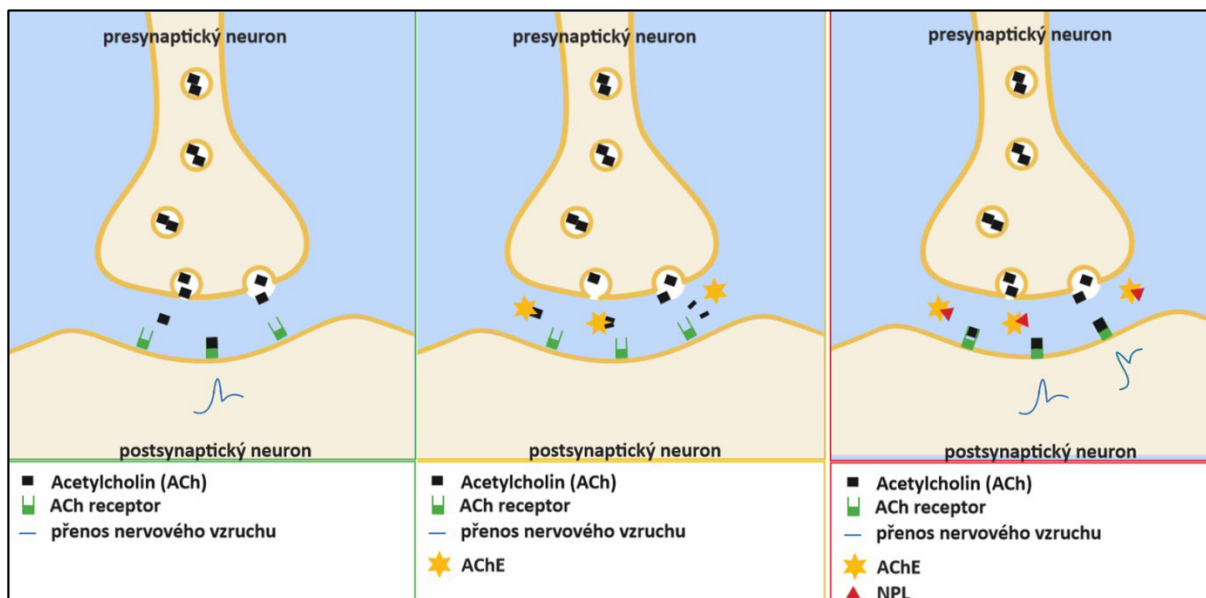
Látka	LD ₅₀ (mg/kg), p.o.
tabun	3,6 ^a
sarin	0,7 ^a
soman	0,4 ^a
VX	0,2 ^a
VR	1,4 ^a
malathion	1400-2800 ^b
pirimiphos-methyl	2100 ^b
chlorpyrifos-methyl	1700-2100 ^b

^a (Misik J et al. 2015b), ^b (Shelton K a Luper Ch 2010)



Obrázek 2. Příklady chemických struktur některých insekticidů.

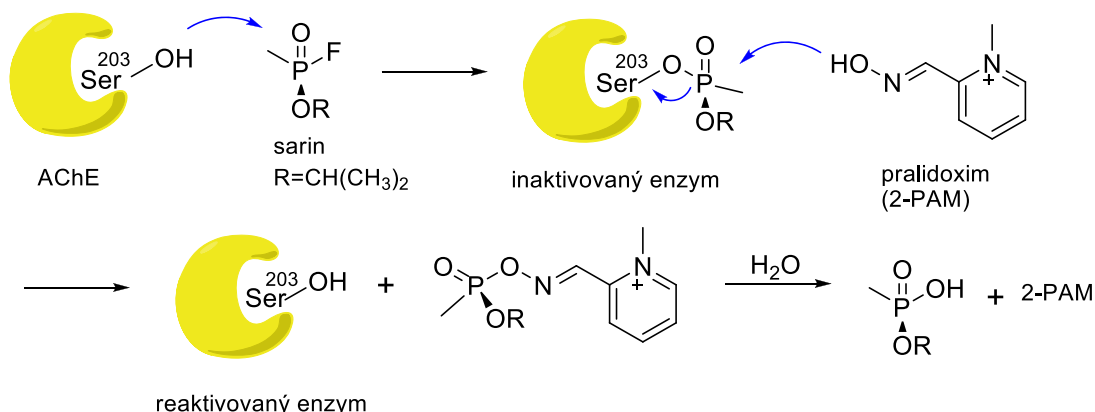
Mechanismus toxického účinku NPL spočívá v ireverzibilní inhibici enzymu AChE (E.C. 3.1.1.7). Inhibicí AChE dochází k ovlivnění cholinergního přenosu, kdy se kumuluje neuromediátor acetylcholin (ACh) na nervových synapsích. ACh je syntetizován z cholinu, který je následně acetylován pomocí enzymu cholinacetyltransferasy (ChAT, E.C. 2.3.1.6). Při přenosu vzruchu (nervového, nervosvalového) dochází k vazbě ACh na příslušný cholinergní receptor. Po navázání na receptor je ACh za fyziologických podmínek ihned rozkládán prostřednictvím katalytického působení AChE. Ireverzibilní inhibice AChE vede ke kumulaci ACh v presynaptické štěrbině, což má za následek nadměrnou stimulaci cholinergních receptorů. Toto nadměrné dráždění cholinergních receptorů je hlavní příčinou příznaků akutní otravy NPL (Obr. 3), kterou lze rovněž charakterizovat jako akutní cholinergní krizi, projevující se muskarinovými, nikotinovými a centrálními příznaky (Bajgar J et al. 2007; Worek F et al. 2008).



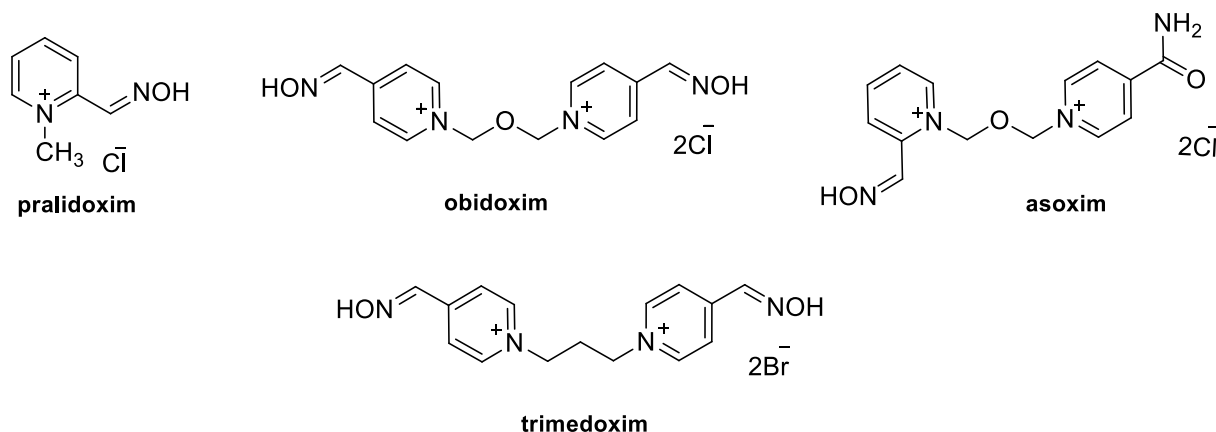
Obrázek 3. Mechanismus účinku NPL.

Legenda: přenos nervového vzruchu: □, rozklad ACh pomocí AChE: ★, inhibice AChE: ▲

Základem terapie intoxikací NPL je antidotní terapie, sestávající z podávání funkčních antidot (anticholinergik) spolu s kauzálními antidoty (reaktivátory AChE). Anticholinergika zabraňují účinkům nahromaděného ACh na cholinergních receptorech. Nejpoužívanějším léčivou látkou z této skupiny je atropin. Atropin blokuje účinek ACh na periferních muskarinových receptorech, ale je málo účinný na nikotinových receptorech a špatně proniká přes hematoencefalickou bariéru (HEB) (Cong X et al. 2019). Reaktivátory AChE mají schopnost obnovovat (reaktivovat) aktivitu AChE inhibované NPL (Obr. 4). Mezi nejznámější používané reaktivátory patří pralidoxim, trimedoxim, obidoxim a asoxim (HI-6) (Obr. 5). Vzhledem k rychlosti účinku a vysoké toxicitě NPL nabývají na významu ochranná a preventivní opatření s cílem zabránit průniku noxy do organismu (Patočka J 2004). V Armádě České republiky (AČR) se zajišťuje ochrana prostředky individuální ochrany, dekontaminací postižené kůže a farmakologickou profylaxí (Bajgar J 2004).



Obrázek 4. Schéma obnovení činnosti AChE pomocí pralidoximu (2-PAM). Ser203 je aminokyselina tvořící základ tzv. katalytické triády. Společně s Glu202 a His447 tvoří funkční jednotku AChE. Číslování aminokyselin odpovídá lidské AChE.



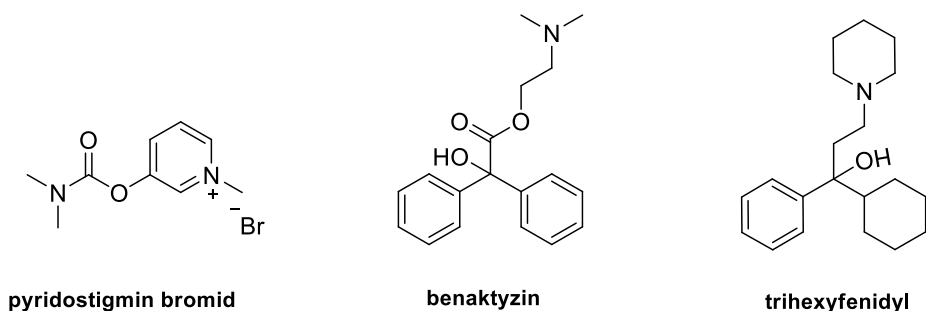
Obrázek 5. Chemické struktury nejpoužívanějších reaktivátorů AChE.

Současná farmakologická profylaxe

Profylaxe by měla být dostupná vždy tam, kde se předpokládá expozice NPL. V praxi nachází praktické uplatnění pyridostigmin bromid (dále jen pyridostigmin). Jedná se o karbamátový inhibitor AChE, který se už přes více než 50 let souběžně používá k léčbě onemocnění myasthenia gravis. Roku 1991, ve válce v Perském zálivu, byl pyridostigmin podáván vojákům jako ochrana proti případné expozici NPL. O několik let později byla tato látka schválena americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) jako profylaktikum proti intoxikaci somanem. Z několika již dříve publikovaných studií bylo prokázáno, že tento inhibitor AChE je účinný pouze v kombinaci s následnou antidotní léčbou (Patočka J 2004; Lorke DE a Petroianu GA 2019).

V dnešní době je pyridostigmin široce používán jako profylaktikum ve většině vyspělých armád světa (členské státy NATO). Jeho výhodou je, že neovlivňuje bojové schopnosti vojáků. Jako nevýhoda se uvádí jeho nedostatečná profylaktická účinnost proti NPL, související s jeho sníženou prostupností přes hematoencefalickou bariéru (HEB) (Patočka J 2004).

V AČR je pyridostigmin součástí přípravku PANPAL, který se skládá z tablety A (benaktyzin 0,8 mg a trihexyfenidyl 0,6 mg) a z tablety B (pyridostigmin bromid 35 mg) (Obr. 6). Benaktyzin a trihexyfenidyl jsou anticholinergní látky s převahou působení v CNS, jsou tak schopné mírnit nežádoucí účinky pyridostigminu a současně potencovat jeho profylaktický efekt. Dalším profylaktickým přípravkem je TRANSANT s obsahem oximu HI-6 (0,8 g). Jedná se o dvě transdermální náplasti, ze kterých se HI-6 vstřebává přes kůži po dobu až 8 hodin. Kombinace PANPALU a TRANSANTU (obr. 7) vede k potenciaci profylaxe a v současnosti se jedná o nejlépe validované profylaktické prostředky proti NPL (Patočka J 2004).



Obrázek 6. Chemická struktura látek obsažených v PANPALU.



Obrázek 7. Profylaktika PANPAL a TRANSANT. Převzato z BAJGAR, Jiří. sciencedirect.com [online]. [cit. 26.4.2019]. Dostupný na WWW: <https://www.sciencedirect.com/book/9780124160477/nerve-agents-poisoning-and-its-treatment-in-schematic-figures-and-tables>

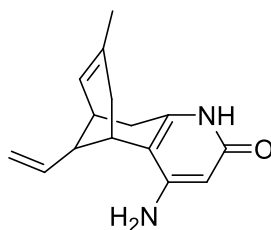
Nové přístupy k profylaxi otrav NPL

Profylaktické podání reverzibilních inhibitorů AChE na bázi karbamátů často vede k výskytu četných nežádoucích účinků, které jsou následkem dočasné inhibice AChE. Jedná se o projevy, jako např. slinění, bronchiální sekrece, mióza, třes atd. Výskyt těchto nežádoucích účinků směřuje výzkum k novým potenciálním reverzibilním inhibitorům AChE se strukturou odlišující se od karbamátů. Příkladem může být alkaloid huperzin A (Hup-A) (Watts P a Wilkinson 1977).

Hup-A (Obr. 8), seskviterpenový alkaloid izolovaný z Vrance pilovitého (*Huperzia serrata*, Lycopodiaceae) (Obr. 9), je účinný, reverzibilní inhibitor AChE. V minulosti byla tato rostlina používána v čínské medicíně při horečnatých stavech a v terapii zánětu (Patocka J 1998). V současnosti je Hup-A schváleným léčivem pro léčbu Alzheimerovy choroby v Číně. V USA je užíván pouze jako nootropikum (Lallement G et al. 2002)

Studie z roku 1996 prováděná na myších a opicích premedikovaných Hup-A, které byly následně vystaveny působení 1,3 LD₅₀ somanu, uvádí, že Hup-A je slibné antidotum a profylaktikum proti otravám somanem, s předpokladem působení proti jiným NPL (Ashani Y et al. 1996). Další studie na morčatech (Lallement G et al. 2001a, 2001b) rovněž prokázala profylaktickou účinnost Hup-A proti somanu, kdy Hup-A redukoval četnost výskytu záchvatů, neuropatologických změn za současného snížení mortality. Premedikace Hup-A v dávce 0,5 mg/kg i.p. zcela zabránila záchvatům a zajistila přežití všech zvířat v průběhu 24 hodin po expozici 1,5 LD₅₀ somanem. Vyšetření postmortem ukázalo, že hipokampus zůstal nepoškozen. Studie rovněž naznačila, že Hup-A je vhodným profylaktikem s účinkem v periferním i centrálním kompartmentu.

V dalších studiích stejné vědecké skupiny byla porovnávána profylaktická účinnost mezi pyridostigminem, fyzostigminem a Hup-A při intoxikaci somanem u morčat a opic. Během experimentu byla dávka somanu potřebná k vyvolání křečí a záchvatů 1,55krát vyšší u opic premedikovaných Hup-A ve srovnání se skupinami, kterým byly aplikovány karbamáty. Hup-A se navíc vyznačuje snadným průnikem přes HEB, čímž dosahuje větší protektivní účinnosti ve srovnání s pyridostigminem. Komplex Hup-A-AChE je poměrně dlouhodobě stabilní v porovnání s ostatními komplexy tvořenými AChE a karbamáty (např. pyridostigmin, fyzostigmin) (Damar U et al. 2017). Toto do značné míry koresponduje i s relativně krátkodobým plasmatickým poločasem pyridostigminu ($t_{1/2}$ = 23-85 min, psi, i.v. aplikace) oproti Hup-A ($t_{1/2}$ = 716 min, lidé, p.o. aplikace) (Li YX et al. 2007; Baker PR et al. 1978).



huperzin A

Obrázek 8. Chemická struktura Hup-A.



Obrázek 9. Huperzia serrata. Převzato z Obrázek 9: TIGERENTE. wikidata.org [online]. [cit. 26.4.2019].
Dostupný na WWW: https://www.wikidata.org/wiki/Q1044073#/media/File:Huperzia_selago.jpg

Mezi další potenciální profylaktika patří tetrahydroakridinové deriváty (Obr. 10). Základní molekulou této skupiny je takrin (THA). Jedná se o tricyklický primární amin, který byl syntetizován už roku 1945 jako sloučenina s možnými antibakteriálními vlastnostmi (Adrien A 1945). Následné experimenty ukázaly, že THA patří mezi velmi účinné inhibitory cholinesteras (Edith H 1961; Shaw FH a Bentley G 1949) a může tak být použit jako prokognitivum u lidí trpících Alzheimerovou chorobou (Summers WK et al. 1986; Becker R et al. 1988). Později si THA získal pozornost i jako potenciální profylaktikum proti otravě organofosforovými sloučeninami (Bajgar et al. 1984). Ve studii z roku 1994 byl THA testován *in vitro* a *in vivo*, kdy byl potvrzen nejen jeho inhibiční účinek vůči AChE, ale i zajímavá profylaktická účinnost. Tento fakt byl podpořen celkovou redukcí tzv. zestárlé AChE. Proces stárnutí AChE je chemická reakce, při které dochází k dealkylaci, popř. deaminaci komplexu AChE-NPL. Takto změněný komplex již nemůže podléhat reaktivaci (Patočka J 2004). Výsledky *in vivo* experimentů poukázaly na možnost snížení letality somanu u králíků premedikovaných THA i atropinem (Fricke FR et al. 1994). Galli a Mori předložili studii, ve které byl podáván THA jak s atropinem, tak i bez tohoto antimuskarinika, u myši v modelu intoxikace diisopropyl fluorofosfátem (DFP). Výsledkem bylo snížení letálního účinku DFP. Prokázali také, že THA chrání centrální AChE před inhibicí *O*-etyl-S-[2-dimethylaminoetyl]metylfosfonothioátem (Galli A a Mori F 1991).

Ve studii publikované roku 1989 byla prezentována distribuce THA (3,2 mg/kg, i.p.) do mozku myši, kde bylo dosaženo vyšší koncentrace léčiva (2,5 pM) ve srovnání s plazmou (0,3 pM) po 20 minutách od aplikace (Nielsen JA et al. 1989). Tento fakt dokazuje, že THA je primárně centrálně působícím inhibitorem AChE. Vedle toho autoři studie prokázali negativní účinky THA na chování u myši, které se vyskytly už při podání 3,2 mg/kg takrinu a při vyšších dávkách (5,6, 17,8 a 32 mg/kg) došlo k výraznému poklesu pohybové aktivity. Kromě těchto vedlejších příznaků se THA vyznačuje zejména hepatotoxicitou, což byl jeden z hlavních důvodů vedoucích k jeho stažení z trhu (Lagadic-Gossman D et al. 1998; Galisteo M et al. 2000; McEneny-King A et al. 2017).

7-Metoxi-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin (7-MEOTA) je strukturním analogem takrinu. Jedná se také o reverzibilní inhibitor AChE, avšak oproti THA se vyznačuje podstatně nižší toxicitou (Tab. 2) (Dejmek L 1990). Rozdílnost v toxicitě mezi THA a 7-MEOTA je dána odlišným metabolismem obou sloučenin (Soukup O et al. 2013). V AČR se používá jako antidotum proti psychicky zneschopňující látce 3-chinuklidyl benzylátu (Misík J et al. 2015a).

Tabulka 2. Porovnání akutní toxicity mezi 7-MEOTA a THA.

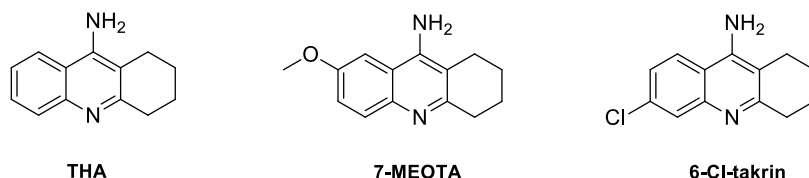
Akutní toxicita	7-MEOTA		THA	
	myši	potkani	myši	potkani
LD₅₀ (i.m.)	125 mg/kg	258 mg/kg	29 mg/kg	34 mg/kg
LD₅₀ (p.o.)	-	53 mg/kg	-	103 mg/kg

6-Chlorotakrin (6-Cl-takrin) je další sloučeninou vykazující potenciální profylaktický účinek. Jedná se o vysoce selektivní a účinný inhibitor AChE. Z nedávno publikované studie (Kassa J a Korabecny J 2017) bylo prokázáno, že 6-Cl-takrin poskytuje ochranu organismu před intoxikací somanem u myši. Dále bylo zjištěno, že je tento inhibitor účinnější a méně toxický než běžně používaný karbamát pyridostigmin (Tab. 3) (Kassa J et al. 2017).

Tabulka 3. Profylaktický efekt reversibilních inhibitorů AChE vůči LD₅₀ somanu u myši.

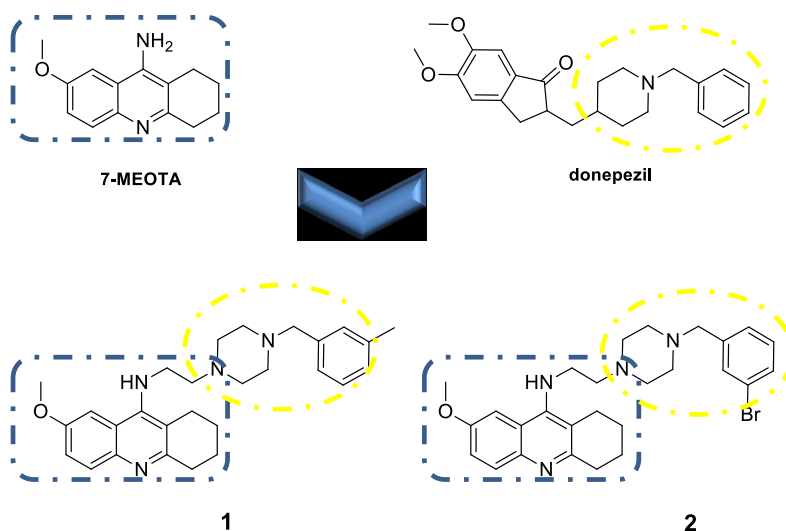
Profylaxe	LD ₅₀ (mg/kg) ± 95% CL	Protektivní index*
-	49,5 (34,0-72,1)	-
pyridostigmin	47,0 (39,3-78,1)	0,95
6-Cl-takrin	67,3 (58,5-75,7)	1,36

* hodnota LD₅₀ somanu u myši, kterým bylo podáno profylaktikum/hodnota LD₅₀ somanu u myši bez profylaxe.

**Obrázek 10.** Chemické struktury tetrahydroakridinových inhibitorů AChE.

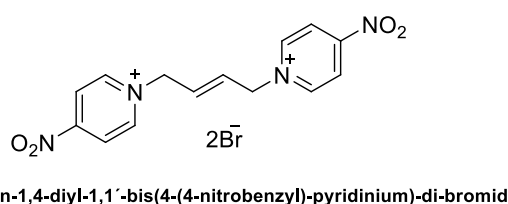
Na základě výše uvedených informací o inhibičním účinku takrinových derivátů, byly syntetizovány nové hybridní sloučeniny, kombinující ve své struktuře fragmenty 7-MEOTA a donepezilu. Donepezil je strukturně odlišný inhibitor AChE s relativně nízkou toxicitou, který prokázal příznivé účinky na kognitivní funkce u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Knowles J 2006). Jako léčivo pro lidi trpící touto nemocí byl schválen FDA roku 1996 (Sugimoto et al. 2000; Valis M et al. 2017). Sloučeniny na bázi donepezil/takrinu mohou být rozděleny podle cílového mechanismu účinku na selektivní inhibitory AChE, neselektivní inhibitory AChE, inhibitory agregace Aβ₁₋₄₀, inhibitory BACE-1, látky s antioxidačními vlastnostmi atd. (Ismaili L et al. 2017; Unzeta M et al. 2016).

Donepezil/takrinové látky **1** (7-metoxi-*N*-(2-{4-[(3-methylfenyl)methyl]piperazin-1-yl}ethyl)-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amintrihydrochlorid) a **2** (*N*-(2-{4-[(3-bromfenyl)methyl]piperazin-1-yl}ethyl)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amintrihydrochlorid) (Obr. 11) patří do skupiny neselektivních inhibitorů AChE. Kinetické studie s AChE potvrdily, že jsou tyto sloučeniny schopné vazby jak do katalytického tak i do periferního aniontového místa enzymu (Korabecny J et al. 2014). Experimenty prováděné *in vivo* a *ex vivo* poukázaly na schopnost těchto sloučenin inhibovat nikotinové a muskarinové cholinergní receptory a tím snižovat vliv nadměrné stimulace cholinergního receptoru během otravy organofosfátem (Sepsova V et al. 2015). Obě struktury mohou tak být považovány za potenční kandidáty při léčbě Alzheimerovy choroby (Korabecny J et al. 2014) i využitelné proti otravám NPL (Misik et al. 2015).

**Obrázek 11.** Chemické struktury donepezil/takrinových sloučenin **1** a **2**.

Za účelem profylaxe proti NPL bylo testováno, ať už samostatně nebo v kombinaci, podávání různých léčiv. Mezi tyto sloučeniny patří např. blokátory kalciového kanálu (nimodipin), neuromuskulární blokátory (tubokurarin) a memantin ze skupiny aminoadamantanů. Jejich profylaktický potenciál však nedosáhl uspokojivých výsledků. Naproti tomu, pozitivní profylaktický efekt byl prokázán při použití procyklidinu, který vykazuje antimuskarinové účinky. Zvláštní pozornost může být zaměřena na suramin (inhibitor proteázy). Jeho podání spolu s atropinem před expozicí somanem poskytuje vysoký profylaktický efekt. Všechny tyto studované látky nicméně neprokázaly vyšší účinnost v porovnání s pyridostigminem (Bajgar J 2004).

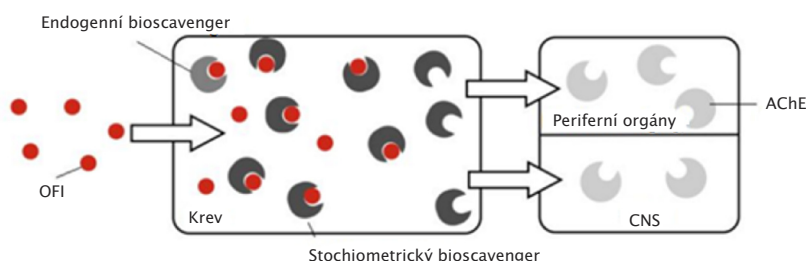
Další možnost v profylaxi intoxikací OF se nabízí v podobě biskvarterních sloučenin. Autoři studie (Pavlikova R et al. 2010) se zaměřili na přípravu symetrických biskvarterních inhibitorů AChE, u kterých byla testována jejich inhibiční schopnost metodou *in vitro*. Jako nejúčinnější inhibitor AChE byla shledána sloučenina but-(2*E*)-en-1,4-diyl-1,1'-bis(4-(4-nitrobenzyl)-pyridinium)-di-bromid (Obr. 12). Uvedená sloučenina prokázala největší schopnost inhibovat potkaní AChE, nicméně profylaktická data ve studii chybí.



Obrázek 12. Chemická struktura biskvarterního inhibitoru.

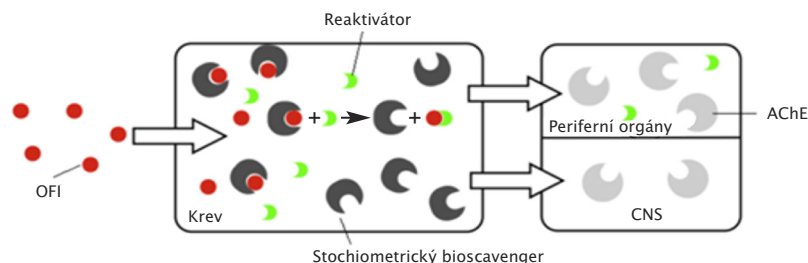
Novějším přístupem k prevenci otrav NPL je použití tzv. bioscavengerů. Jedná se o enzymy se schopností neutralizovat molekuly NPL v krevním řečišti ještě dříve, než se dostane na místo svého toxického účinku. V lidském těle (v kůži, v tkáních, v krvi) se přirozeně vyskytuje celá řada endogenních enzymů a proteinů schopných interagovat s malými dávkami NPL a neutralizovat jejich účinek. Při vyšší expozici však není jejich účinek dostatečný, proto je nutná jejich suplementace (Nachon F et al. 2013). Účinek bioscavengerů by měl být zejména rychlý a specifický. Ideálně by měly být tyto enzymy účinné proti širokému spektru NPL a neměly by vyvolávat imunitní odpověď. Bioscavengery můžeme rozdělit podle funkce na stochiometrické, pseudokatalytické a katalytické (Rochu D et al. 2007).

Stochiometrické bioscavengery zahrnují přirozeně se vyskytující lidské proteiny – cholinesterasy (AChE a BChE, EC 3.1.1.8) a karboxylesterasy. Jsou to enzymy, které jsou schopny vázat jednu molekulu NPL na jednu molekulu proteinu (Obr. 13). Nejvíce prozkoumaným proteinem v této oblasti je lidská butyrylcholinesterasa (*h*BChE). Používá se zejména purifikovaná *h*BChE izolovaná z krevní plasmy. Pro dostatečný účinek jsou potřebné vysoké dávky *h*BChE. Nevýhodou jsou omezené zdroje lidské plasmy potřebné pro izolaci enzymu, proto se produkce zaměřila na rekombinantní *h*BChE. Strukturní rozdíly mezi *h*BChE a rekombinantní *h*BChE vedou k tomu, že je nutno rekombinantní *h*BChE povrchově modifikovat, např. pegylací nebo fúzí na lidský albumin a tím tak prodloužit biologický poločas. Rekombinantní *h*BChE je v současnosti již dostupná jako přípravek Protexia, který se vyrábí biotechnologicky z mléka transgenních koz (Bajgar et al. 2019).



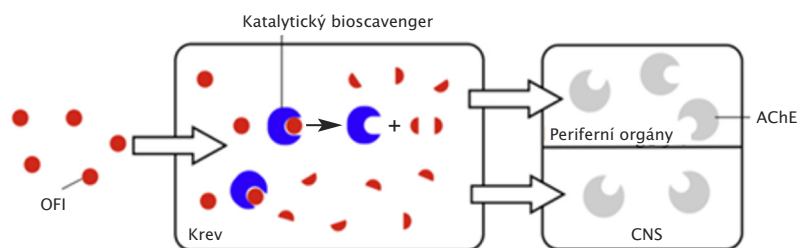
Obrázek 13. Mechanismus působení stochiometrických scavengerů.

Funkce pseudokatalytických scavengerů spočívá v současném podání enzymu vázajícího NPL a specifického reaktivátoru. Při podání cholinesterasy dojde ke zvýšení její koncentrace v krvi, NPL se na ni naváže a reaktivátor následně obnoví enzymovou aktivitu. Tím vzniká opět funkční enzym (Obr. 14) (Nachon F et al. 2013).



Obrázek 14. Mechanismus působení pseudokatalytických bioscavengerů.

Katalytické bioscavengery jsou enzymy se schopností hydrolyzovat NPL v krevním řečišti (Trovast-Leroy M et al. 2011). Malé množství katalytických bioscavengerů poskytuje lepší ochranu než velké množství finančně nákladných stochiometrických bioscavengerů (Masson P 2011). Nyní se výzkum zabývá několika typy enzymů, jmenovitě mutovanými cholinesterasami, lidskou paraoxonasou 1 (PON-1), bakteriální fosfotriesterasou, případně dalšími savčími enzymy (Obr. 15) (Trovast-Leroy M et al. 2011).



Obrázek 15. Mechanismus působení katalytických bioscavengerů.

Závěr

Současná terapie otrav NPL pomocí kauzálních antidot má své limity (nízká prostupnost oximových reaktivátorů, úzké spektrum účinku aj.). I přes tyto nedostatky je však schopna zachránit intoxikovaného jedince před letálními účinky NPL. Nedostatky léčby lze rovněž spatřovat v dlouhodobém horizontu po intoxikaci NPL. I přes záchranu života jedince může mít otrava OF za následek snížení výkonnosti, poruchy chování, synkopy a možné trvalé poškození mozku. Z těchto důvodů se výzkum zaměřuje na alternativní přístupy, zejména pak na profylaxi otrav NPL. Jeden z takových přístupů představuje použití přirozených nebo geneticky upravených detoxikačních látek/proteinů tzv. bioscavengerů. I když se jejich použití dostává stále více do popředí, přináší sebou i nespočet nevýhod, které narážejí zejména na technologické limity. Enzym musí být rychle dostupný ve velkém množství, musí být aktivní proti širokému spektru OF sloučenin, musí vykazovat termální stabilitu a mít potlačenou imunogenitu. V neposlední řadě hrají také důležitou roli ekonomické aspekty průmyslové výroby těchto proteinů.

Vzhledem k těmto obtížím, je v současné době profylaxe otrav NPL zaměřena na ochranu AChE před ireverzibilní inhibicí NPL. Praktického využití dosáhl pyridostigmin, který je široce používán jako profylaktikum ve většině armád světa (členské státy NATO). Mezi další zvažovaná profylaktika patří např. Hup-A či akridinové deriváty (Lallement G et al. 2002; Bajgar et al. 2019).

Bylo zkoumáno velké množství potenciálně účinných látek proti otravám NPL, ale jen malá část byla zavedena do výzbroje různých armád nebo je komerčně dostupná. Profylaxe založena na kombinaci různých sloučenin jakými jsou např. proteázový inhibitor suramin, benzodiazepiny, memantin, procyklidin, nimodipin s již zavedenými profylaktiky je předmětem dalšího výzkumu stejně jako hledání nových potenciálních sloučenin poskytující ochranu před intoxikací NPL.

Funding

The work was supported by Long-term development plan (Faculty of Military Health Sciences), by MH CZ - DRO (University Hospital Hradec Kralove, No. 00179906), by project No. SV/FVZ2019/01 and by Ministry of Health of the Czech Republic (grant No. 17-32801A).

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Adherence to Ethical Standards

This article does not contain any studies involving animals performed by any of the authors.

This article does not contain any studies involving human participants performed by any of the authors.

Reference

1. Patocka J. Vojenská toxikologie. Praha: Grada; 2004. 178 s.
2. Cabal J, Bajgar J. Tabun - návrat po padesáti letech. Chem Listy. 1999;93.
3. Kucera J. Sarin a jiné nervové jedy: nástroj války a terorismu. Kontakt. 2004;6.
4. Hurnik Z, Tuma P. Encyklopedie Světový terorismus: od starověku až po útok na USA. Praha: Svojtka & Co.; 2001.
5. Pitchamnn V. Historie chemické války. Praha: Military Systém Line, s.r.o.; 1999.
6. Prymula P. Biologický a chemický terorismus: informace pro každého/. 1. leden 2002;
7. Pita R, Domingo J. The Use of Chemical Weapons in the Syrian Conflict. Toxics. září 2014;2(3):391–402.
8. Patocka J. Před 160 lety byl syntetizován nervový jed tetraethylpyrofosfát (TEPP). Prevence Urazu Otrav Nasili. 1. leden 2014;10:169–72.
9. Gupta RC, editor. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. 1 edition. Amsterdam: Academic Press; 2009. 1168 s.
10. Worek F, Horst Thiermann, Szinicz L, Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. Biochem Pharmacol. 1. prosinec 2004;68(11):2237–48.
11. Misik J, Pavlikova R, Cabal J, Kuca K. Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. Drug Chem Toxicol. 2. leden 2015;38(1):32–6.
12. Shelton K, Luper Ch. Pesticide Applicator Certification Series Toxicity of Pesticides Oklahoma Cooperative Extension Fact Sheets. In 2010.
13. Bajgar J, Fusek J, Kuca K, Bartosova L, Jun D. Treatment of Organophosphate Intoxication Using Cholinesterase Reactivators:Facts and Fiction. Mini-Rev Med Chem. 1. květen 2007;7(5):461–6.
14. Worek F, Aurbek N, Wetherell J, Pearce P, Mann T, Thiermann H. Inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds: Pig versus minipig acetylcholinesterase. Toxicology. únor 2008;244(1):35–41.
15. Cong X, Min SN, Wu LL, Cai ZG, Yu GY. [Role and mechanism of muscarinic acetylcholine receptor in the regulation of submandibular gland secretion]. Beijing Da Xue Xue Bao. 18. červen 2019;51(3):390–6.
16. Bajgar J. Organophosphates / Nerve Agent Poisoning: Mechanism of Action, Diagnosis, Prophylaxis, And Treatment. In: Advances in Clinical Chemistry [Internet]. Elsevier; 2004. s. 151–216. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242304380066>

17. Lorke DE, Petroianu GA. Reversible cholinesterase inhibitors as pretreatment for exposure to organophosphates. A review. *J Appl Toxicol JAT*. leden 2019;39(1):101–16.
18. Watts P, Wilkinson R. The interaction of carbamates with acetylcholinesterase. *Biochem Pharmacol*. duben 1977;26(8):757–61.
19. Patocka J. Huperzine A--an interesting anticholinesterase compound from the Chinese herbal medicine. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 1998;41(4):155–7.
20. Lallement G, Baille V, Dominique Baubichon, Carpentier P, Collombet JM, Filliat P, et al. Review of the value of huperzine as pretreatment of organophosphate poisoning. *Neurotoxicology*. květen 2002;23(1):1–5.
21. Ashani Y, Grunwald J, Kronam C, Velan B, Shafferman A. Studies with Huperzine A a new candidate in the research of prophylaxis against nerve agent. *Proc Med Def Biosci Rev*. 1996;105–10.
22. Lallement G, Foquin A, Dorandeu F, Baubichon D, Aubriot S, Carpentier P. Subchronic Administration of Various Pretreatments of Nerve Agent Poisoning. I. Protection of Blood and Central Cholinesterases, Innocuousness Towards Blood-Brain Barrier Permeability. *Drug Chem Toxicol*. 1. leden 2001;24(2):151–64.
23. Lallement G, Foquin A, Dorandeu F, Baubichon D, Carpentier P. Subchronic Administration of Various Pretreatments of Nerve Agent Poisoning. II. Compared Efficacy Against Soman Toxicity. *Drug Chem Toxicol*. 1. leden 2001;24(2):165–80.
24. Damar U, Gersner R, Joshua TJ, Steven S, Rotenberg A. Huperzine A: A promising anticonvulsant, disease modifying, and memory enhancing treatment option in Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*. únor 2017;99:57–62.
25. Li YX, Zhang RQ, Li CR, Jiang XH. Pharmacokinetics of huperzine A following oral administration to human volunteers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1. prosinec 2007;32(4):183–7.
26. Baker PR, Calvey TN, K C, Macnee CM, Taylor k. Plasma clearance of neostigmine and pyridostigmine in the dog. *Br J Pharmacol*. červenec 1978;63(3):509–12.
27. Adrien A. Improved syntheses of aminoacridines. Part IV: Substituted 5-sminoacridines. *J Socitey Chem Ind*. 1945;64:169–72.
28. Edith H. Inhibition of Cholinesterases by Tetrahydroaminacrin. *Acta Chem Scand*. 1961;(15):1386–90.
29. Shaw FH, Bentley G. Some aspects of the pharmacology of morphine with special reference to its antagonism by 5-amino-acridine and other chemically related compounds. *Med J Aust*. 17. prosinec 1949;2(25):868–74.
30. Summers WK, Majovski LV, Marsh GM, Tachiki K, Kling A. Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *N Engl J Med*. 13. listopad 1986;315(20):1241–5.
31. Becker R, Giacobini E, Elble R, McIlhany M, Sherman K. Potential pharmacotherapy of Alzheimer disease. A comparison of various forms of physostigmine administration. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1988;116:19–32.
32. Bajgar J, Patocka J, Fusek J, Hrdina V. Some possibilities of protection against acetylcholinesterase inhibition by organophosphates in vivo. *Sb Vedeckych Pr Lek Fak Karlovy Univ V Hradci Kralove*. 1984;27(4):425–35.
33. Fricke FR, Koplovitz I, Scharf B, Rockwood AG. Efficacy of Tacrine as a Nerve Agent Pretreatment. *Drug Chem Toxicol*. leden 1994;17(1):15–34.
34. Galli A, Mori F. Effectiveness of 1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine (THA) as a pretreatment drug for protection of mice from acute diisopropylfluorophosphate (DFP) intoxication. *Arch Toxicol*. 1991;65(4):330–4.
35. Nielsen JA, Mena EE, Williams IH, Nocerini M, Liston D. Correlation of brain levels of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) with neurochemical and behavioral changes. *Eur J Pharmacol*. listopad 1989;173(1):53–64.
36. Lagadic-Gossman D, Rissel M, Le Bot MA, Guillouzo A. Toxic effects of tacrine on primary hepatocytes and liver epithelial cells in culture. *Cell Biol Toxicol*. říjen 1998;14(5):361–73.
37. Galisteo M, Rissel M, Sergeant O, Chevanne M, Cillard J, Guillouzo A, et al. Hepatotoxicity of tacrine: occurrence of membrane fluidity alterations without involvement of lipid peroxidation. *J Pharmacol Exp Ther*. červenec 2000;294(1):160–7.
38. McEneny-King A, Osman W, Edginton NA, Rao P. Cytochrome P450 binding studies of novel tacrine derivatives: Predicting the risk of hepatotoxicity. *Bioorg Med Chem Lett*. 01 2017;27(11):2443–9.
39. Dejmek L. 7-MEOTA. *Drugs Future*. 1990;15(2):126–9.
40. Soukup O, Jun D, Zdarova-Karasova J, Patocka J, Musilek K, Korabecny J, et al. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Curr Alzheimer Res*. říjen 2013;10(8):893–906.
41. Misik J, Korabecny J, Nepovimov E, Cabelova P, Kassa J. The effects of novel 7-MEOTA-donepezil like hybrids and N-alkylated tacrine analogues in the treatment of quinuclidinyl benzilate-induced behavioural deficits in rats performing the multiple T-maze test. *Biomed Pap*. 3. prosinec 2015;159(4):547–53.

42. Kassa J, Korabecny J. Dose Dependent Prophylactic Efficacy of 6-Chlorotacrine in Soman-Poisoned Mice. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2017;60(4):140–5.
43. Kassa J, Korabecny J, Nepovimova E. The Evaluation of Benefit of Newly Prepared Reversible Inhibitors of Acetylcholinesterase and Commonly Used Pyridostigmine as Pharmacological Pretreatment of Soman-Poisoned Mice. *Acta Medica Hradec Kralove Czech Repub*. 18. duben 2017;60(1):37–43.
44. Knowles J J. Donepezil in Alzheimer's disease: an evidence-based review of its impact on clinical and economic outcomes. *Core Evid*. 2006;1(3):195–219.
45. Sugimoto, Yamanishi, Iimura Y, Kawakami Y. Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Med Chem*. březem 2000;7(3):303–39.
46. Valis M, Masopust J, Vysata O, Hort J, Dolezal R, Tomek J, et al. Concentration of Donepezil in the Cerebrospinal Fluid of AD Patients: Evaluation of Dosage Sufficiency in Standard Treatment Strategy. *Neurotox Res*. 2017;31(1):162–8.
47. Ismaili L, Refouvelet B, Benchekroun M, Brogi S, Brindisi M, Gemma S, et al. Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2017;151:4–34.
48. Unzeta M, Esteban G, Bolea I, Fogel W, Ramsay RR, Youdim M, et al. Multi-Target Directed Donepezil-Like Ligands for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2016;10:205.
49. Korabecny J, Dolezal R, Cabelova P, Horova A, Hrubá E, Ricny J, et al. 7-MEOTA-donepezil like compounds as cholinesterase inhibitors: Synthesis, pharmacological evaluation, molecular modeling and QSAR studies. *Eur J Med Chem*. 23. červenec 2014;82:426–38.
50. Sepsova V, Zdarova-Karasova J, Tobin G, Jun D, Korabecny J, Cabelova P, et al. Cholinergic properties of new 7-methoxytacrine-donepezil derivatives. *Gen Physiol Biophys*. duben 2015;34(2):189–200.
51. Pavlikova R, Marek J, Musilek K, Fusek J, Kuca K, Zdarova-Karasova J. Nové biskvarterní inhibitory acetylcholinesterasy jakožto profylaktika při otravě organofosfáty. *MMSL*. 1. červen 2010;79(2):46–9.
52. Nachon F, Brazzolotto X, Trovaslet M, Masson P. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chem Biol Interact*. 5. prosinec 2013;206(3):536–44.
53. Rochu D, Chabrière E, Masson P. Human paraoxonase: a promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. *Toxicology*. 20. duben 2007;233(1–3):47–59.
54. Bajgar J, Kassa J, Kucera T, Musilek K, Jun D, Kuca K. Some Possibilities to Study New Prophylactics against Nerve Agents. *Mini Rev Med Chem*. 28 2019;
55. Trovaslet-Leroy M, Musilova L, Renault F, Brazzolotto X, Misik J, Novotny L, et al. Organophosphate hydrolases as catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents. *Toxicol Lett*. 25. září 2011;206(1):14–23.
56. Masson P. Evolution of and perspectives on therapeutic approaches to nerve agent poisoning. *Toxicol Lett*. 25. září 2011;206(1):5–13.