

615.7/547.1' 118.5/-099-092.9:615.9-085.525

ÚČINNOST ASYMETRICKÝCH BISPYRIDINIOVÝCH OXIMŮ HI-6 A BI-6 JAKO ANTIDOT OTRAVY SOMANEM U POTKANA

Pplk. doc. MUDr. Jiří KASSA, CSc.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové
(rektor: plk. doc. MUDr. Svatopluk Býma, CSc.)

Úvod

Přes dobrou znalost základního mechanismu účinku vysoce toxických organofosforových (OF) sloučenin, kterým je ireverzibilní inhibice acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) následovaná akumulací endogenního acetylcholinu (ACh) na cholinergních receptorech a narušením cholinergního přenosu nervového vzruchu (1, 16), není antidotní terapie akutních intoxikací těmito noxami uspokojivě vyřešena (2, 7). Největší léčitelnou se jeví akutní intoxikace somanem (pinakolyl methylfluorofosfonát) z důvodu velmi rychlé monodealkylace komplexu enzym-inhibitor (9) a z důvodu uvolňování somanu z depotních míst v průběhu intoxikace (11, 18).

Základem antidotní terapie akutních otrav vysoce toxickými OF sloučeninami je kombinace oximu, reaktivujícího OF-inhibovanou AChE, s anticholinergikem, které zabraňuje nadměrné aktivaci cholinergních receptorů acetylcholinem (1, 7). V případě intoxikace somanem však ani dosud nejslibnější oxim HI-6 v kombinaci s anticholinergikem (atropin, benaktyzin) neprokázal zcela uspokojivý efekt (2, 12, 17), přestože jeho terapeutické zásahy do intoxikace OF sloučeninami přesahují prostý reaktivizační efekt (21).

Za účelem dalšího zvýšení efektu léčby akutní intoxikace somanem jsou proto vyvíjeny nové monopyridiniové a bispyridiniové oximy, mezi něž

patří i nový asymetrický bispyridiniový oxim BI-6 (1-[4-karbamoylpyridinium]-4-[2-hydroxyiminomethylpyridinium]-2-buten dibromid), syntetizovaný v naší laboratoři, který se liší od oximu HI-6 nejen spojovacím můstkem mezi oběma pyridiniovými kruhy, ale i vyšší stabilitou v roztocích (3).

Cílem této práce je srovnat terapeutickou účinnost nového bispyridiniového oximu BI-6 s oximem HI-6 cestou stanovení míry reaktivace somanem-inhibované brániční a mozkové AChE a stanovení střední účinné dávky (ED_{50}) schopné eliminovat následky supraletální intoxikace somanem (2-3 násobkem hodnoty LD_{50}) u potkana.

Materiál a metody

Jako pokusná zvířata byli použiti samci bílých potkanů kmene Wistar chovu Konárovice o hmotnosti 180-220 g. Potkani byli krmeni standardní Larsenovou dietou a napájeni vodou ad libitum. Při stanovování míry reaktivace somanem inhibované AChE byl potkanům podáván i. m. buď samotný atropin (21 mg/kg) nebo atropin v kombinaci s oximem v ekvimolárním množství (100 μ mol/kg) 5 minut před i. m. intoxikací somanem v dávce 80 μ g/kg (LD_{50}). Za třicet minut po intoxikaci byla zvířata usmrcena dekapitací a byla jim odebrána bránice a mozek, v jejichž homogenátech byla vzápětí stanovena aktivita AChE spektrofotometrickou

metodou podle Ellmana a spol. (8). Kontrolním zvířatům byl místo noxy a léčiv podáván fyziologický roztok ve stejném objemu (0,1 ml/kg hmotnosti). Míra (%) reaktivace byla počítána podle vzorce (6): $100 - [(atropin + oxim) - (kontrola)] / [(atropin) - (kontrola)] \times 100$

Při stanovení hodnot střední účinné dávky testovaných oximů (ED_{50}) byly oximy podávány i. m. v kombinaci s atropinem (21 mg/kg) v postupně se zvyšujících dávkách 5 minut před intoxikací soma-nem z důvodu stanovení jejich maximální terapeutické účinnosti. Soman byl podáván též i. m. v dávce odpovídající dvojnásobku nebo trojnásobku hodnoty LD_{50} , která pro potkany činí 80 μ g/kg (1). Úmrtnost pokusných zvířat byla sledována do 24 a 48 hodin po intoxikaci. Potkani, kteří přežili intoxikaci, byli ponecháni do 7. dne na pozorování z důvodu vyloučení pozdního úmrtí. Pokud byl potkanům podán samotný atropin (bez oximu), všechna pokusná zvířata uhynula do 2 hodin po intoxikaci. Příslušné hodnoty ED_{50} s intervaly spolehlivosti na 95% hladině významnosti (95% IS) byly počítány probitovou metodou (19). Nakonec byla stanovena míra bezpečnosti zjištěné efektivní dávky oximu (SR) pomocí poměru hodnoty střední smrtné dávky oximu (LD_{50}) k hodnotě ED_{50} .

Výsledky

Hodnoty míry reaktivace somanem inhibované brániční a mozkové AChE oximy HI-6 a BI-6 jsou uvedeny v tabulce 1. Z těchto údajů vyplývá, že na periférii dosahuje oxim HI-6 signifikantně vyšší míry reaktivace somanem inhibované AChE než oxim BI-6 ($p < 0,05$), zatímco v CNS je míra reaktivace somanem inhibované AChE stejná bez ohledu na výběr oximu (tab. 1). Hodnoty LD_{50} obou testovaných oximů jsou uvedeny v tabulce 2. Svědčí o tom, že nově syntetizovaný oxim BI-6 je téměř 3krát toxičtější než oxim HI-6 (tab. 2). Hodnoty středních účinných dávek obou sledovaných oximů (ED_{50}) a míra jejich bezpečnosti vzhledem k jejich toxicitě (SR) jsou uvedeny v tabulce 3 a 4. Pokud byli potkani intoxikováni somanem v dávce rovnající se dvojnásobku hodnoty LD_{50} , byly oba oximy schopny částečně eliminovat toxické účinky somanu, byť v poměrně vysoké dávce. Nebyl přítomn žádný významný rozdíl ve střední účinné dávce oximu s ohledem na čas přežití pokusných zvířat. Naproti tomu byl zjištěn statisticky významný rozdíl v účinnosti mezi oběma testovanými oximy. Oxim HI-6 dokázal eliminovat toxické účinky somanu v signifikantně nižší dávce než oxim BI-6 ($p < 0,05$) (tab. 3). Pokud byli potkani intoxikováni somanem v dávce odpovídající trojnásobku hodnoty LD_{50} , pouze oxim HI-6 byl schopen zajistit přežití alespoň poloviny intoxikovaných zvířat. Oxim BI-6 byl v tomto případě v netoxických dávkách (do 25% LD_{50}) prakticky neúčinný (tab. 4).

Tabulka 1

Reaktivace somanem inhibované brániční a mozkové AChE

Terapie	AChE aktivita (μ kat/kg)	
	brániční	mozek
atropin	1,13 $\pm$ 0,17	29,6 $\pm$ 2,5
atropin + BI-6	4,32 $\pm$ 0,68*	66,6 $\pm$ 5,5*
% reaktivace	14,0	14,0
atropin + HI-6	6,48 $\pm$ 1,02*	69,8 $\pm$ 5,8*
% reaktivace	23,4	15,3

V tabulce jsou uvedeny průměry $\pm$ SE průměru ($n=6$). Signifikanční rozdíly mezi skupinami na 95% hladině významnosti ($p < 0,05$) jsou označeny *.

Tabulka 2

Hodnoty střední smrtné dávky (LD_{50}) testovaných oximů

OXIMY	LD_{50} (mg/kg) $\pm$ 95% IS
BI-6	266,3 (248,5 - 285,4)
HI-6	781,3 (738,4 - 826,6)

Tabulka 3

Terapeutická účinnost (ED_{50}) a míra bezpečnosti (SR) testovaných oximů u potkanů intoxikovaných dvojnásobkem LD_{50} somanu

OXIMY	Doba přežití	ED_{50} (mg/kg) $\pm$ 95% IS	SR (LD_{50}/ED_{50})
BI-6	24 h	37,1 (28,9 - 31,3)	7,2
	48 h	39,8 (30,4 - 50,2)	6,7
HI-6	24 h	20,0 (17,2 - 23,2)	39,2
	48 h	24,8 (19,6 - 31,3)	31,5

Tabulka 4

Terapeutická účinnost (ED_{50}) a míra bezpečnosti (SR) testovaných oximů u potkanů intoxikovaných trojnásobkem LD_{50} somanu

OXIMY	Doba přežití	ED_{50} (mg/kg) $\pm$ 95% IS	SR (LD_{50}/ED_{50})
BI-6	24 h	> 70	< 4,0
	48 h	> 70	< 4,0
HI-6	24 h	52,3 (48,1 - 56,9)	14,9
	48 h	54,7 (50,7 - 58,9)	14,3

Diskuse

Všechny výše uvedené výsledky jen potvrzují obtížnost terapie akutní intoxikace somanem bez ohledu na výběr antidot. K eliminaci toxických účinků somanu v letálních a subletálních dávkách je nutné podat poměrně vysoké dávky antidot ve srovnání s terapií akutních intoxikací jinými vysoce toxickými OF sloučeninami (13, 14, 22).

Srovnáme-li účinné dávky oximů HI-6 a BI-6 schopné eliminovat toxické účinky supraletální dávky somanu odpovídající dvojnásobku hodnoty LD_{50} u poloviny exponovaných potkanů, zjistíme, že signifikantně účinnější se jeví oxim HI-6. Tento fakt podporuje i zjištění, že v případě intoxikace potkanů trojnásobkem LD_{50} somanu není oxim BI-6 v terapeutických dávkách (do 25 % LD_{50}) na rozdíl od oximu HI-6 schopen eliminovat toxické účinky somanu u žádného z pokusných zvířat. Navíc je oxim HI-6 relativně netoxický (17) na rozdíl od oximu BI-6, kde jeho toxicitu podmiňuje přítomnost transbutenu v molekule (3).

Jednou z příčin vysokého terapeutického efektu oximu HI-6 je jeho vysoká reaktivací účinnost na periférii, která je signifikantně vyšší ve srovnání s oximem BI-6. Nebude to však jediná příčina vysokého léčebného efektu HI-6, zvláště když si uvědomíme jeho relativně malou reaktivací účinnost v CNS, která je dána jeho obtížnou a nedostatečnou penetrací přes hemato-encefalickou bariéru z důvodu biskvarterní chemické struktury (4, 5).

Zdá se tedy, že příčinou vysokého terapeutického efektu oximu HI-6 ve srovnání s BI-6 budou vedle reaktivity somanem inhibované AChE i jiné terapeutické mechanismy, jako jsou přímý antimuskarinový, antinikotinový a ganglion blokující účinek, restaurace somanem indukované neuromuskulární blokády a benefiční efekt na kardiovaskulární a respirační systém (10, 15, 20, 21).

Závěrem lze konstatovat, že asymetrický bispiridinový oxim HI-6 zůstává přes pokračující vývoj nových reaktivátorů AChE i nadále nejúčinnějším a nejperspektivnějším oximem pro terapii akutních intoxikací somanem.

Souhrn

V pokusech na samcích potkana byla testována terapeutická a reaktivací účinnost asymetrických bispiridinových oximů HI-6 a BI-6 vůči somanu cestou stanovení míry reaktivity somanem inhibované brániční a mozkové acetylcholinesterázy a střední účinné dávky (ED_{50}) oximu pro terapii supraletální intoxikace potkana při 24hodinovém přežívání intoxikovaných zvířat.

Zatímco v brániční způsobil oxim HI-6 signifikantně vyšší reaktivaci somanem inhibované acetylcholinesterázy než oxim BI-6, v mozku se míra reaktivity somanem inhibované acetylcholinesterázy v závislosti na výběru oximu nezměnila. Střední účinná dávka oximu HI-6 nezbytná ke 24hodinovému přežití potkanů intoxikovaných dvojnásobkem LD_{50} somanu je ve srovnání s oximem BI-6 signifikantně nižší. Trojnásobek hodnoty LD_{50} somanu přežila experimentální zvířata pouze v případě terapie oximem HI-6.

Uvedené údaje svědčí o tom, že nově syntetizovaný oxim BI-6 nedosahuje terapeutické účinnosti

dosud nejslibnějšího oximu HI-6 pro terapii otravy somanem.

Poděkování

Autor děkuje paní J. Petrové za technickou spolupráci a za pomoc při statistickém zpracování výsledků a Ing. J. Bielavskému za syntézu obou oximů.

Literatura

- BAJGAR, J.: Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz - účinek, diagnóza a terapie. 1. vyd. Praha. Avicenum, 1985. 40 s.
- BAJGAR, J.: Present views on toxicodynamics of soman poisoning. *Acta Med.*, 1996, vol. 39, p. 101-105.
- BIELAVSKÝ, J. - KASSA, J. - ELSNEROVÁ, I. - DEJMEK, L.: Cholinesterase reactivators derived from 2-pyridinaldoxime. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1998, vol. 63, p. 199-204.
- CLEMENT, JC.: HI-6: Reactivation of central and peripheral acetylcholinesterase following inhibition by soman, sarin and tabun in vivo in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 1982, vol. 31, p. 1283-1287.
- CLEMENT, JC.: Central activity of acetylcholinesterase oxime reactivators. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1992, vol. 112, p. 104-109.
- CLEMENT, JC. - HANSEN, AS. - BOULET, CA.: Efficacy of HL-67 and pyrimidoxime as antidotes of nerve agent poisoning in mice. *Arch. Toxicol.*, 1992, vol. 66, p. 216-219.
- DAWSON, RM.: Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *J. Appl. Toxicol.*, 1994, vol. 14, no. 5, p. 317-331.
- ELLMAN, GL., et al.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, vol. 7, p. 88-95.
- FLEISHER, JH. - HARRIS, LW.: Dealkylation as a mechanism for aging of cholinesterase after poisoning with pinacolymethylphosphonofluoridate. *Biochem. Pharmacol.*, 1965, vol. 14, p. 641-648.
- CHEN, HCH. - BAI, DY. - JIANG, YP.: Effect of HI-6 on muscle acetylcholine receptor: analysis on minimal reaction model. *Acta Pharmacol. Sin.*, 1996, vol. 17, p. 428-431.
- KADAR, T., et al.: Distribution of 3H -soman in mice. *Arch. Toxicol.*, 1985, vol. 58, p. 45-49.
- KASSA, J.: Comparison of efficacy of two oximes (HI-6 and obidoxime) in soman poisoning in rats. *Toxicology*, 1995, vol. 101, p. 167-174.
- KASSA, J. - CABAL, J. - BAJGAR, J. - SZINICZ, L.: The choice: HI-6, pralidoxime or obidoxime against nerve agents? *ASA Newslett.*, 1997, vol. 97, no. 4, p. 16-18.
- KOPLOVITZ, I. - STEWART, JR.: A comparison of the efficacy of HI-6 and 2-PAM against soman, tabun, sarin and VX in the rabbit. *Toxicol. Lett.*, 1994, vol. 70, p. 269-279.
- KOSTENIS, E., et al.: Evidence for a multiple binding mode of bispiridinium-type allosteric modulators of muscarinic receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 1996, vol. 314, p. 385-392.
- MARRS, TC.: Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.*, 1993, vol. 58, p. 51-66.
- ROUSSEAU, CG. - DUA, AK.: Pharmacology of HI-6, an H series oxime. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1989, vol. 67, p. 1183-1189.
- SHAPIRA, S., et al.: Effects of CBDP and MEPQ on the toxicity and distribution of 3H -soman in mice. *Arch. Toxicol.*, 1990, vol. 64, p. 663-668.
- TALLARIDA, R. - MURRAY, R.: Manual of pharmacological calculation with computer programs. New York. Springer-Verlag, 1987. 145 p.
- TATTERSALL, JEH.: Ion channel blockade by oximes and recovery of diaphragm muscle from soman poisoning in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 1993, vol. 108, p. 1006-1015.
- Van HELDEN, HPM., et al.: Pharmacological effects of

oximes: how relevant are they? Arch. Toxicol., 1996, vol. 70, p. 779-786.

22. WOLTHUIS, O. - BERENDS, F. - MEETER E.: Problems in the therapy of soman poisoning. Fundam. Appl. Toxicol., 1981, vol. 1, p. 183-189.

Klíčová slova: Soman; Acetylcholinesteráza; Bránice; Mozek; HI-6; BI-6; Potkan.

Do redakce došlo 30. 1. 1998