

615.784.5:615.9:356.33

IN VITRO POROVNÁNÍ REAKTIVAČNÍ ÚČINNOSTI POTENCIONÁLNÍCH SYMETRICKÝCH BISKVARTÉRNÍCH REAKTIVÁTORŮ ACETYLCHOLINESTERÁZY LIŠÍCÍCH SE DÉLKOU SPOJOVACÍHO ŘETĚZCE

Kamil KUČA, Jiří CABAL

Katedra toxikologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

Souhrn

Byla porovnána reaktivační účinnost dvou potenciálních reaktivátorů acetylcholinesterázy inhibované nervově paralytickou látkou VX – 1,3-bis(2-hydroxyiminomethypyridinium) propan dibromidu a 1,4-bis(2-hydroxyiminomethypyridinium) butan dibromidu. Ukázalo se, že oxim s delším spojovacím řetězcem je lepším reaktivátorem VX-inhibované acetylcholinesterázy.

Klíčová slova: Acetylcholinesteráza; Látka VX; Oximy; Reaktivace.

An In Vitro Comparison of the Reactivator Efficacy of Potential Symmetric Bisquaternary Acetylcholinesterase Reactivators Which Differ in Their Connecting Chain Length

Summary

The reactivation potencies of two potential reactivators of the VX-inhibited acetylcholinesterase – 1,3-bis(2-hydroxyiminomethypyridinium) propane dibromide and 1,4-bis(2-hydroxyiminomethypyridinium) butane dibromide were compared. Oxime with its longer connecting chain seems to be a better reactivator of VX-inhibited acetylcholinesterase.

Key words: Acetylcholinesterase; VX agent; Oximes; Reactivation.

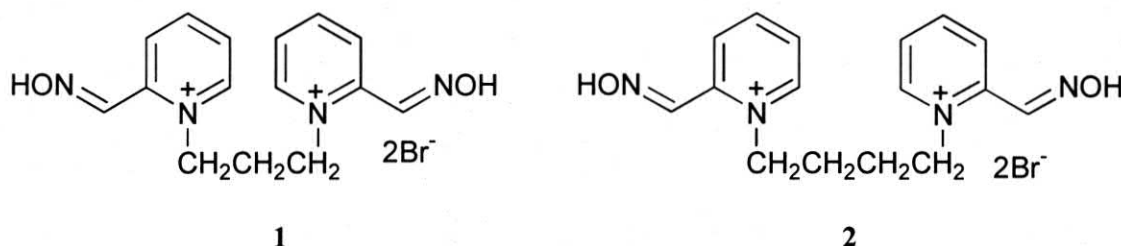
Úvod

Neurotoxické organofosforové sloučeniny užívané v současné době jako nervově paralytické látky (sarin, soman, tabun, cyklosarin nebo látka VX) patří mezi látky, které „nevratně“ inhibují enzym – acetylcholinesterázu (AChE; EC 3.1.1.7). Jejich inhibiční efekt je způsoben fosforylací serinové hydroxy-skupiny v aktivním místě enzymu (1, 2).

Látka VX [O-ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl)-methylthiofosfonát] je vysoce toxický organofosfonát vyvinutý v 60. letech 20. století (3, 4).

Mezi běžně užívané reaktivátory organofosfáty –

inhibované AChE patří monopyridiniové (pralidoxim) či bispyridiniové oximy (obidoxim, methoxim, trimedoxim či oxim HI-6). Žádný z dosud známých reaktivátorů acetylcholinesterázy nedokáže efektivně reaktivovat acetylcholinesterázu inhibovanou všemi známými organofosfáty (5). V této práci je *in vitro* testována reaktivační účinnost dvou potenciálních reaktivátorů AChE 1,3-bis(2-hydroxyiminomethypyridinium) propan dibromidu [1] a 1,4-bis(2-hydroxyiminomethypyridinium) butan dibromidu [2] již dříve syntetizovaných na našem pracovišti (obr. 1).



Obr.1: Struktura potenciálních reaktivátorů AChE

Experimentální část

Chemikálie

Oximy 1,3-bis(2-hydroxyiminomethylpyridinium)propan dibromid 1 [bod tání 253–256 °C; pKa1 = 7,13 a pKa2 = 8,55] a 1,4-bis(2-hydroxyiminomethylpyridinium)butan dibromidu 2 [bod tání 235 °C; pKa1 = 7,12 a pKa2 = 8,07] byly již dříve syntetizovány na našem pracovišti. Jejich čistota byla verifikována pomocí HPLC (Spectra Physics Instrument vybavená UV 1000 detektorem a Purospher RP-18E kolonou), ^1H -NMR (Varian Gemini 300; 300 MHz) a elementární analýzou (Perkin Elmer CHN Analyzer 2400 Serie II).

Látka VX (O-ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl)-methylthiofosfonát) byla získána z VOZ 072 Zemianské Kostolany (Slovenská republika) a její čistota byla 95 %. Všechny další chemikálie byly získány komerční cestou.

In vitro experiment

In vitro testování bylo provedeno standardním postupem (6, 7). Jako zdroje enzymu AChE bylo užito 10% homogenátu z krysích mozků. Homogenát byl 30 minut inkubován s látkou VX. Po inhibici byl k reakční směsi přidán oxim o známé koncentraci. Aktivita AChE byla měřena potenciostatickou metodou titrátorem RTS 822 (Radiometer, Dánsko) (8). Disociační konstanta charakterizující komplex enzym–reaktivátor (K_{dis}) a disociační konstanta charakterizující komplex reaktivátor–inhibovaný enzym (K_R) společně s rychlostní konstantou prvního řádu (k_R) byly získány z rychlostí enzymové reakce. Bimolekulární konstanta reaktivace (k_r), která charakterizuje celkovou reaktivační účinnost reaktivátoru, byla vypočtena z rovnice ($k_r = k_R/K_R$) (9). Schopnost oximů reaktivovat AChE inhibovanou látkou VX byla vyjádřena jako procentuální vzrůst aktivity reaktivovaného enzymu v reakční směsi.

Výsledky a diskuse

Při celkovém porovnání výsledků reaktivace AChE inhibované látkou VX se jeví jako lepší reaktivátor oxim 1,4-bis(2-hydroxyiminomethylpyridinium)butan dibromid (látka 2). Ovšem dílčí výsledky již tak jednoznačné nejsou. Ze srovnání hodnot konstanty K_{dis} , která charakterizuje vznik komplexu reaktivátor–enzym, vyplývá vyšší afinita pro látku 2, zatímco konstanta K_R , která popisuje komplex reaktivátor–inhibovaný enzym [EIR], favorizuje látku 1. Rychlostní konstanta prvního řádu k_R látky 1 je třikrát vyšší než pro látku 2. Protože tato

rychlostní konstanta charakterizuje pouze dílčí reakci celé reaktivace – rozpad komplexu reaktivátor–inhibovaný enzym (viz schéma 1) a opětovný vznik reaktivovaného enzymu [E], není její hodnota směrodatná pro rychlost celé reaktivace.

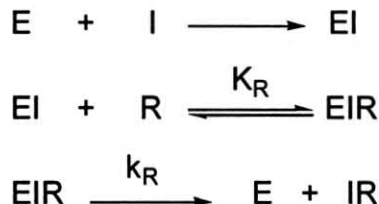


Schéma 1: Kinetika reaktivace inhibovaného enzymu

Ukazatelem charakterizujícím celou reaktivaci je bimolekulární konstanta reaktivace (k_r) (9). Ze srovnání hodnot této konstanty vyplývá, že reaktivace zprostředkovaná látkou 2 probíhá 25krát rychleji než reaktivace zprostředkovaná látkou 1.

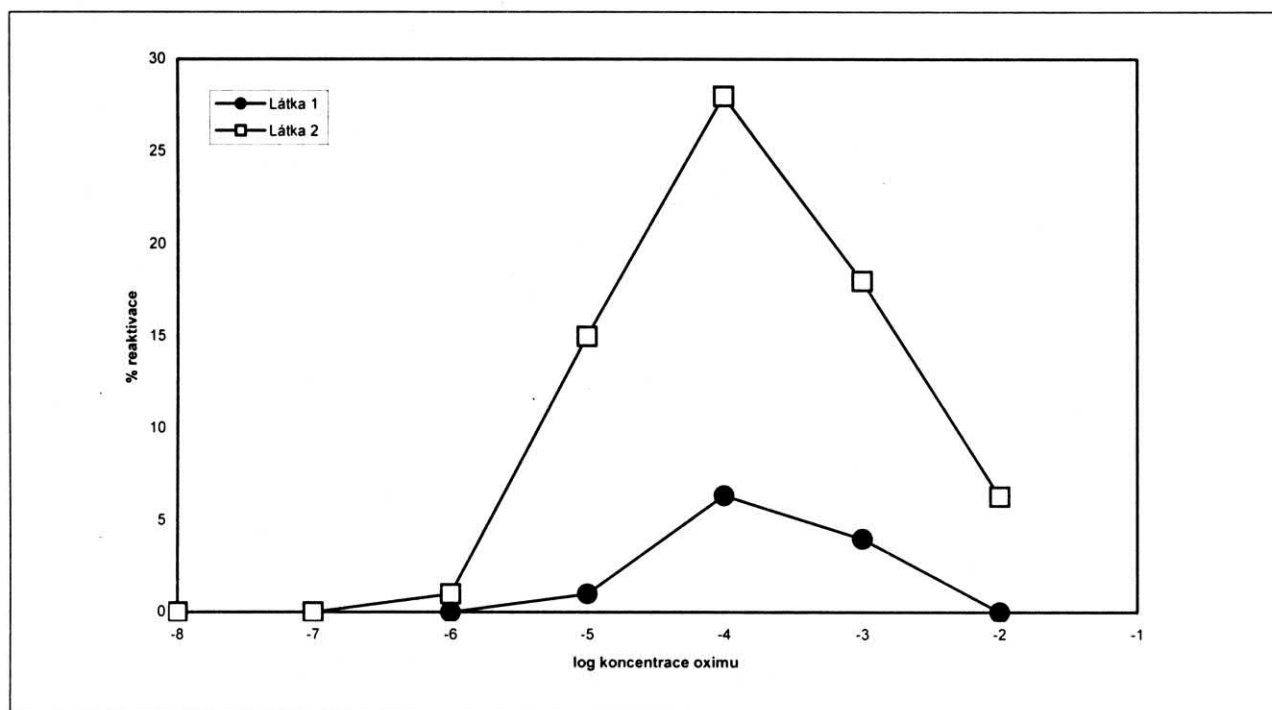
Tabulka 1

Kinetické hodnoty charakterizující reaktivační schopnost testovaných oximů

Látka	K_{dis} [M]	K_R [M]	k_R [min^{-1}]	k_r [$\text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$]
1	3,5	1350	0,131	98
2	100	16	0,040	2469

Ze srovnání maximálního dosaženého procenta reaktivace se jeví stejně jako při porovnáních bimolekulárních konstant reaktivace (k_r) účinnější látka 2 (graf 1). Obě látky mají reaktivační maximum [%] při koncentraci oximu 10^{-4} M. Látka 2 ovšem při této koncentraci způsobuje 4,5krát vyšší reaktivaci VX-inhibované AChE než látka 1.

Díky téměř stejné chemické struktuře obou testovaných sloučenin lišících se pouze délkou spojovacího řetězce můžeme závěrem říci, že délka spojovacího můstku mezi dvěma kvarterními dusíky zásadně ovlivňuje reaktivovatelnost AChE inhibované látkou VX. Tyto výsledky korespondují s výsledky prací, které již dříve byly věnovány podobné tematice (10, 11).



Graf 1

Poděkování

Autoři děkují paní Martině Hrabínové a paní Ivaně Ježkové za technickou pomoc.

Literatura

- MARRS, TC. Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.*, 1993, vol. 58., p. 51–66.
- TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In *Pharmacological Basis of Therapeutics* (Hardman, JG., Limbird, LE. eds.), 9th ed. New York, McGraw Hill, 1992, p. 194.
- ANTONOV, N. Chemical Weapons at the Turn of the Century. *LN* 72-96, p. 32.
- KASSA, J. – KRS, O. – CABAL, J. Základy vojenské toxikologie a ochrany proti BCHL pro posluchače VLA JEP farmaceutického směru. Sv. 273, 1992, s. 39–40.
- KASSA, J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 2002, vol. 40, p. 803–816.
- KASSA, J. – CABAL, J. A Comparison of the efficacy of a new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with presently used oximes and H oximes against sarin by in vitro and in vivo methods. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1999, vol. 18, p. 560–565.
- KUČA, K. – BIELAVSKÝ, J. – CABAL, J. – BIELAVSKÁ, M. Synthesis of a potential reactivator of acetylcholinesterase 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(carbamoylpyridinium)-propane dibromide. *Tetrahedron Lett.*, 2003, vol. 44, p. 3123–3125.
- KASSA, J. – CABAL, J. A Comparison of the efficacy of acetylcholinesterase reactivators against cyclohexyl methylphosphonofluoridate (GF Agent) by in vitro and in vivo methods. *Pharmacol. Toxicol.*, 1999, vol. 84, p. 41–45.
- PATOČKA, J. – BIELAVSKÝ, J. – ORNST, F. Reactivating effect of alpha,omega-bis-(4-pyridinealdoxime)-2-trans-butene dibromide on isopropyl-methylphosphonylated acetylcholinesterase. *FEBS Lett.*, 1970, vol. 10, p. 182–184.
- PATOČKA, J. – BIELAVSKÝ, J. Affinity of bis-quaternary pyridinealdoximes for the active centre of intact and isopropylmethylphosphonylated acetylcholinesterase. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1972, vol. 37, p. 2110–2116.
- KUČA, K. – CABAL, J. Reaktivace cyklosarinem inhibované acetylcholinesterázy. *Chem. Listy*, 2002, roč. 96, s. 950.

Korespondence: Ing. Kamil Kuča

Katedra toxikologie

Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně

Třebešská 1575

500 01 Hradec Králové

e-mail: kucakam@pmfhk.cz

Do redakce došlo 26. 2. 2003