

---

## ZVLÁŠTNÍ RUBRIKA

---

### PŮVODNÍ ZAHRANIČNÍ PŘÍSPĚVKY S ČESKÝM PŘEKLADEM

615.9-085.525

615.9-085.525

#### PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL STUDIES OF HGG- AND BDB-OXIMES

Dragomir DRAGANOV, Christofo DISHOVSKI,  
Ivan SAMNALIEV  
Laboratory of Experimental Toxicology,  
Military Medical Academy, Sofia, Bulgaria

#### FARMAKOLOGICKÉ A TOXIKOLOGICKÉ STUDIE HGG A BDB OXIMŮ

Dragomir DRAGANOV, Christofo DISHOVSKI,  
Ivan SAMNALIEV  
Vojenská lékařská akademie, Sofie, Bulharsko

The therapy of intoxications with organophosphorous compounds (OPC) consists of cholinesterase reactivator, cholinolytic(s) and other symptomatic drugs, such anti-convulsants. OPC which form a rapidly "aged" complex with acetylcholinesterase (AChE) make it difficult for conventional oximes such as 2-PAM, Obidoxime, and TMB-4 to reactivate phosphorylated AChE. In effort to develop more effective antidotes in the seventies a series of bispyridinium oximes, named "H-oximes" after Prof. I. Hagedorn from Freiburg, were synthesized. Some of this oximes (HS-3, HS-6, HI-6) are superior to the conventional oximes in the treatment of poisoning with nerve agents, particularly with soman, and HI-6 has been the most extensively studied ChE reactivator in the last two decades (Rousseaux, C. and A. Dua, 1989). In the eighties two other groups of asymmetric bispyridinium compounds were developed as antidotes against OPC poisoning- the so called HGG- and BDB-oximes (Maximovic et al., 1980; Weger and Szinicz, 1981). Their antidotal action is believed to be due besides the weak AChE reactivation on their interaction with both nicotinic and muscarinic cholinergic receptors (ChR), restoration of neuromuscular transmission blocked by OPC, retardation of the formation of aged inhibitor- oxime complex, chemical combination with OPC, inhibition of the release of acetylcholine and others (Amitai et al., 1980; Jovanovic, 1983; Kirsch and Weger, 1981; Kloog et al., 1985; Skrinjaric- Spoljar and Kralj, 1980).

A series of HGG- and BDB- oximes was synthesized in this laboratory (Draganov et al., 1991; Christova et al., 1992) (Table 1.). The aim of this presentation is to summarize some of the results obtained in the pharmacological and antidotal evaluation of these oximes.

#### Acute toxicity of the oximes

The acute toxicity of the oximes was tested in male ICR mice (18-22) after intraperitoneal application. LD<sub>50</sub> was

Terapie intoxikace organofosfáty (OF) zahrnuje podávání reaktivátorů cholinesteráz, anticholinergik a dalších symptomatických léků, jako např. antikonvulsiv. Organofosfáty, které tvoří s acetylcholinesterázou (AChE) rychle "stárnoucí" komplex, ztěžují konvenčním oximům, jako je 2-PAM, obidoxim a TMB-4 reaktivaci fosforylované AChE. V rámci vývoje účinnějších antidot byla v 70. letech syntetizována řada bispyridiniových oximů, nazývaných H-oximy podle prof. I. Hagedorna z Freiburgu. Některé z těchto oximů (HS-3, HS-6, HI-6) jsou lepší než konvenční oximy při léčbě otrav NPL, zejména somanem. HI-6 je nejintenzivněji studovaný ChE-reaktivátor v posledních dvaceti letech (Rousseaux, C. a Dua, A., 1989). V 80. letech byly vyvinuty další dvě skupiny asymetrických bispyridiniových sloučenin jako antidot proti otravám OF, takzvané HGG a BDB-oximy (Maximovič a spol., 1980; Weger a Szinicz, 1981). Předpokládá se, že jejich účinek jako antidot je dán vedle slabé reaktivity AChE jejich interakcí jak s nikotinovými, tak s muskarinovými cholinoreceptory (ChR), obnovením neuromuskulárního přenosu blokování OF, retardací "stárnutí" komplexu inhibitor-oxim, chemickou reakcí s OF, inhibicí uvolňování acetylcholinu a dalším (Amital a spol., 1980; Jovanovic, 1983; Kirsch a Weger, 1981; Kloog a spol., 1985; Skrinjaric-Spoljar a Kralj, 1980).

V naší laboratoři byla syntetizována řada HGG a BDB-oximů (Draganov a spol., 1991; Christova a spol., 1992) (tab. 1). Cílem tohoto příspěvku je shrnout některé z výsledků získaných při farmakologickém a antidotním vyhodnocení těchto oximů.

#### Akutní toxicita oximů

Akutní toxicita oximů byla testována na samcích ICR myši (18-22) po intraperitoneálním podání. Hodnoty LD<sub>50</sub>

calculated with adapted computer program and was based on 2- and 24-hr mortalities in groups of six animals after Lichfield and Wilcoxon (1949). The results obtained (Fig. 1.) show that the compounds with oxime group in position 4 were more toxic than the 2 analogs. The toxicities of cyclohexylcarbonyl and the respective benzoyl derivatives were of the same magnitude with the exception of BDB-27/HGG-9 couple.

### **Influence of the oximes on breathing, blood pressure and ECG**

Cats (both sexes, 3-4.5 kg) and male Wistar rats (240-280 g) were used throughout this experiments. Experimental procedure for cat was as follows: jugular vein, carotid artery and trachea of anesthetized animals were cannulated for the i. v. administration of the oximes, for measurement of blood pressure (BP) and breathing, respectively. ECG was recorded simultaneously (EKT 111).

After i. v. injection of the oximes (20 mg/kg) the breathing became for a short period more frequent and deeper, returned to normal after the 5th minute. All oximes caused remarkable decrease in BP (maximal at 1-3 min) and heart rate (maximal at 5th min) (Fig. 2). The ECG showed no rhythm or any other disorders.

The arterial pressure and heart rate of rats with and without anaesthesia were registered on the tail artery with BP Recorder 8005 (Ugo Basile). The oximes (HGG-42 or BDB-37; 20 mg/kg) were injected i. m.. No significant changes in arterial pressure and heart rate in the unanaesthetized rats were found after the oxime application (Fig. 3a). After 80/kg i. m. Phenobarbital the BP decreased with ca. 20 mm Hg. A further decrease of BP was found after oxime administration without recovering during the experimental period (Fig. 3b). The heart rate was not significantly affected both after Phenobarbital and oxime.

### **Antidotal effects of the oximes against 1,1,2- tri-methylpropyl methylphosphonofluoridate (TMPhF) poisoning**

1. Index of therapeutic effectiveness (ITE) and median effective doses ( $ED_{50}$ ). Male Wistar rats (175-200 g) were used for this determinations.  $LD_{50}$  of TMPhF and  $ED_{50}$  at 2- and 24-hr were calculated as described above. ITE was the ratio of  $LD_{50}$  of the poison with atropine/oxime treatment to  $LD_{50}$  without treatment. TMPhF was injected i. m. and the antidotes (10 mg/kg Atropine sulfate and oxime) 1 min later in the contralateral leg. The results obtained are presented on Fig. 4 and 5. Best effect was achieved with HGG-42 and BDB-27.

2. Restoration of neuromuscular transmission after block produced with TMPhF.

Cats (both sexes, 3- 4.5 kg) were used throughout this experiments. The jugular vein and trachea of anaesthetized animals were cannulated for the i. v. administration

byly počítány pomocí upraveného počítačového programu a byly založeny na 2hodinové a 24hodinové mortalitě ve skupinách šesti zvířat podle Lichfielda a Wilcoxona (1949). Získané výsledky ukazují (obr. 1), že sloučeniny s oximovou skupinou v pozici 4 byly toxičtější než 2-analogy. Toxicita cyklohexylkarbonylových a benzoylových derivátů byla na stejné úrovni, s výjimkou dvojice BDB 27, HGG 9.

### **Vliv oximů na respiraci, krevní tlak a ECG**

Při experimentech byly použity kočky obojího pohlaví o hmotnosti 3-4 kg a samci potkanů kmene Wistar o hmotnosti 240-280 g. Postup pokusu s kočkami byl následující: Do jugulární žíly, krční tepny a trachey anestezovaných zvířat byly zavedeny kanyly pro i. v. podávání oximů, pro měření krevního tlaku (TK) a respirace. Současně byl zaznamenáván EKG (EKT 111).

Po intravenózním podávání oximů (20 mg/kg) bylo dýchání na krátkou dobu hlubší a jeho frekvence rychlejší, asi po 5 minutách se sledované parametry dýchání vrátily na úroveň kontrolních hodnot. Všechny oximy způsobily významný pokles TK (max. po 1 až 3 min) a tepové frekvence (max. v 5. v minutě) (obr. 2). EKG nevykázaly žádné poruchy rytmu ani jiné patologické změny.

Arteriální tlak a tepová frekvence anestezovaných nebo neanestezovaných potkanů byly zaznamenávány pomocí BP Recorder 8005 (Ugo Basile) na ocasní artérii. Oximy (HGG 42 nebo BDB 37, 20 mg/kg) byly podávány i. m. Po aplikaci oximu nebyly zjištěny žádné významné změny arteriálního tlaku ani tepové frekvence u neanestezovaných potkanů (obr. 3a). Při i. m. podávání 80 mg/kg fenolbarbitalu poklesl krevní tlak asi o 20 mmHg. Další pokles TK bez návratu k normě byl zjištěn po aplikaci oximu během doby experimentu (obr. 3b). Tepová frekvence nebyla významně ovlivněna ani po aplikaci fenolbarbitalu, ani po oximu.

### **Antidotní účinky oximů proti otravě somanem (TMPhF)**

1. Index terapeutické účinnosti (ITE) a střední efektivní dávka  $ED_{50}$

Pro tato stanovení byly použiti potkani kmene Wistar o hmotnosti 175-200 g. Hodnoty  $LD_{50}$  a  $ED_{50}$  pro soman byly počítány ve 2. a 24. hodině, jak již bylo uvedeno. ITE je poměr  $LD_{50}$  intoxikace léčené atropinem a oximem k hodnotě  $LD_{50}$  neléčené intoxikace. Soman byl podáván i. m. a antidota (10mg/kg atropinsulfátu a oximu) o 1 minutu později do druhé zadní končetiny. Získané výsledky jsou demonstrovány na obr. 4 a 5. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s HGG 42 a BDB 27.

2. Obnova neuromuskulárního přenosu po bloádě způsobené somanem

Při těchto pokusech byly použity kočky obojího pohlaví o hmotnosti 3-4,5 kg. Pro i. v. podávání jedu a léků a umělé dýchání byla zavedena kanyla do jugulární žíly

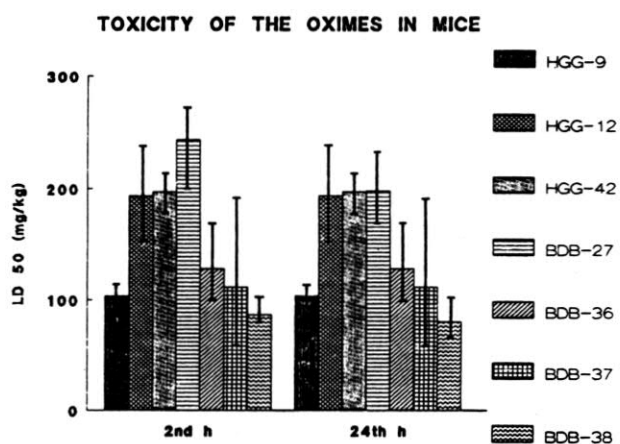


Fig. 1. Acute toxicity of oximes after i. p. application in mice

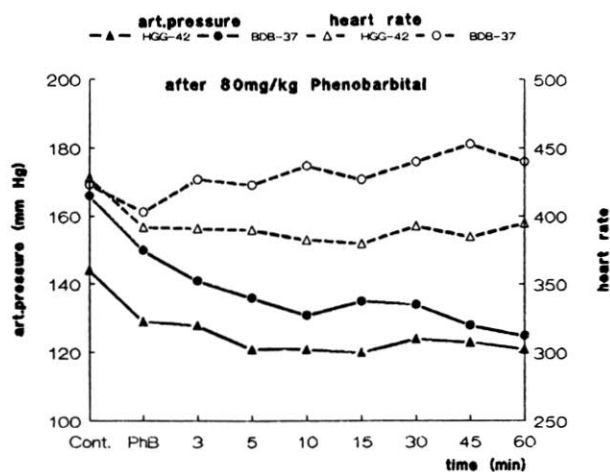
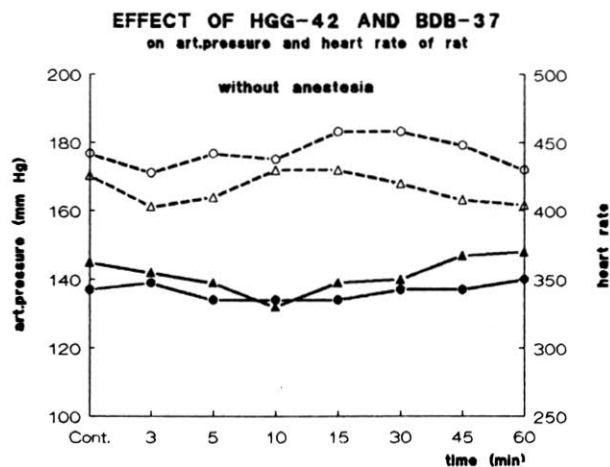


Fig. 3. Effect of 20 mg/kg i. v. HGG-42 and BDB-37 on blood pressure and heart rate of rat

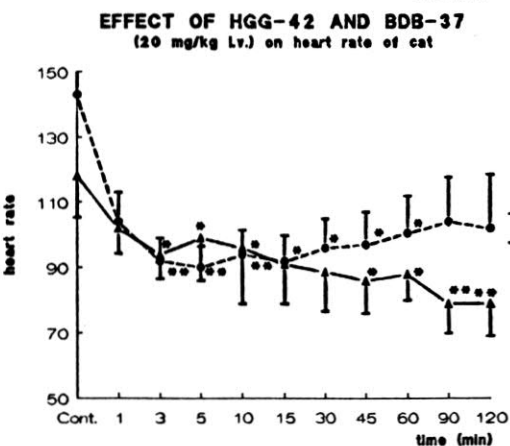
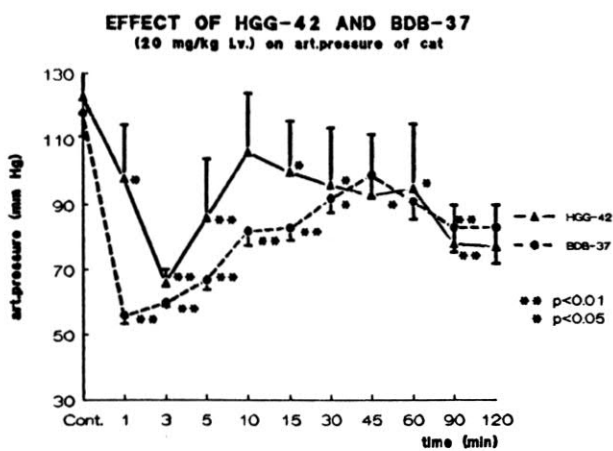


Fig. 2. Effect of 20 mg/kg i. v. HGG-42 and BDB-37 on blood pressure and heart rate of cat

**ED50 OF THE OXIMES AGAINST 1.5LD50 TMPHf combined with Atropine (10 mg/kg)**

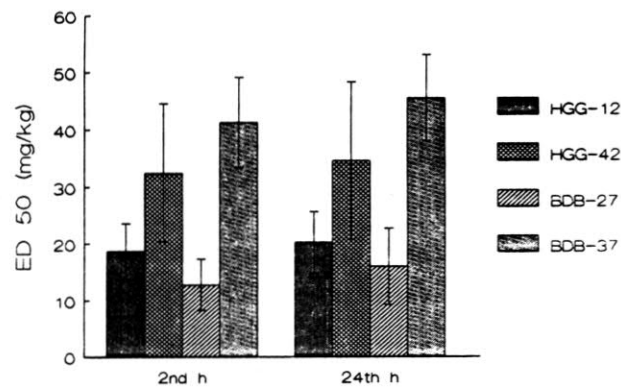


Fig. 4. Median effective doses of oximes combined with atropine (10 mg/kg) against 1.5 LD50 TMPHf

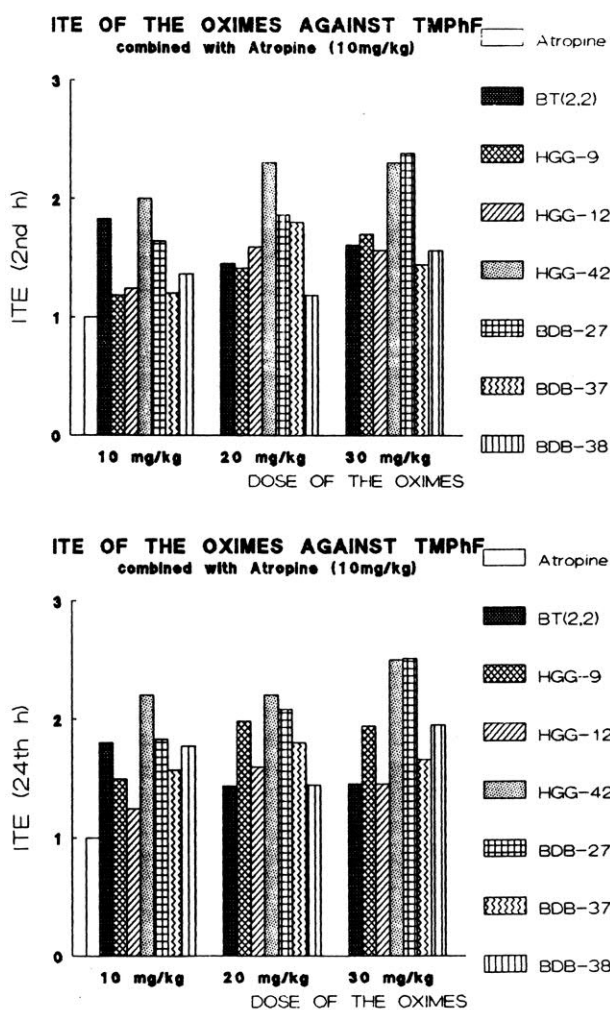


Fig. 5. Index of therapeutic effectiveness of oximes combined with atropine (10 mg/kg) against TMPHF poisoning

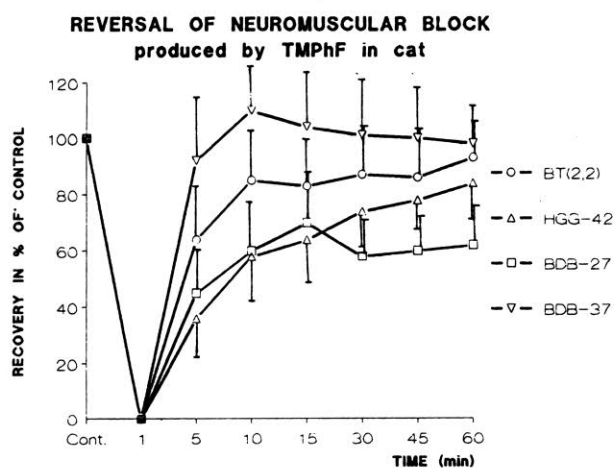


Fig. 6. Reversal of neuromuscular block produced by TMPHF in cat

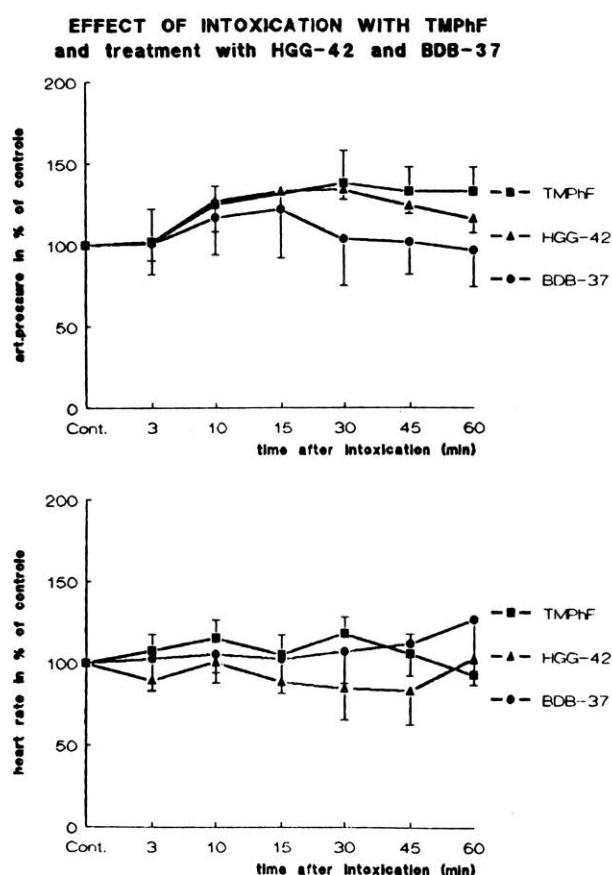
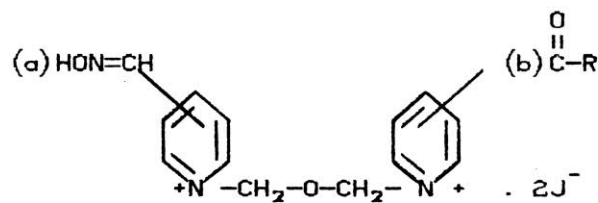


Fig. 7. Effect of intoxication with TMPHF and treatment with 20mg/kg i. m. HGG-42 and BDB-37 on arterial pressure and heart rate in rat



| Compound | a | b | R                         |
|----------|---|---|---------------------------|
| BT (2,2) | 2 | 2 | $\text{C}_6\text{H}_5$    |
| HGG - 9  | 2 | 4 | $\text{C}_6\text{H}_5$    |
| HGG - 12 | 2 | 3 | $\text{C}_6\text{H}_5$    |
| HGG - 42 | 2 | 3 | $\text{C}_6\text{H}_{11}$ |
| BDB - 27 | 2 | 4 | $\text{C}_6\text{H}_{11}$ |
| BDB - 36 | 4 | 3 | $\text{C}_6\text{H}_5$    |
| BDB - 37 | 4 | 3 | $\text{C}_6\text{H}_{11}$ |
| BDB - 38 | 4 | 4 | $\text{C}_6\text{H}_5$    |

Table 1. Structure of the tested oximes

of the poison and drugs, and artificial respiration, respectively. The m. tibialis ant. and n. ischiadicus were prepared according a technique described previously (Samnalliev et al., 1985). The amplitude of contractions of tibial muscle after stimulation of ischiadic nerve was recorded (Ugo Basile 7050). The animals premedicated with 5 mg/kg atropine, were intoxicated with 180 µg/kg TMPHF (10 LD<sub>100</sub>), which produced 100% block of neuromuscular transmission (NMT) within 5 min. The oximes were administered 1 min after the full block of transmission. All the compounds tested restored the neuromuscular function though with different potency the lowest dose which produced 100% recovery was in the 3-50 mg/kg for particular oxime, and the respective time for full restoration between 3 and 15 min. At dose 20 mg/kg BDB-37 was the most potent compound (Fig. 6).

### 3. Effect of oxime treatment on respiration and blood pressure after intoxication with TMPHF.

The experimental animals (cats and Wistar rats) were prepared for registration of respiration and BP as described above. TMPHF was injected in doses 12 µg/kg i. v. (LD<sub>50</sub>) and 80 µg/kg i. m. (1.5 LD<sub>50</sub>) for cat and rat, respectively. A rapid development of respiratory and heart failure was observed after TMPHF intoxication in cat. Oxime treatment (20 mg/kg i. v. 1 min after TMPHF) was without any beneficial effect in antagonizing the depressive action of the poison. After the intoxication with 1.5 LD<sub>50</sub> TMPHF 6 of 8 rats died within the first hour. Oxime treatment (HGG-42 or BDB-37, 20 mg/kg i. m. 3 min after TMPHF) didn't cause any significant changes in BP and heart rate compared with the untreated (Fig. 7.), but remarkable extended the survival time - 3 of 6 animals with each oxime treatment survived till the 60 min after TMPHF.

## Conclusions

HGG- and BDB-oximes couldn't reactivate in vivo TMPHF-inhibited AChE (Draganov et al., 1991), but they have some beneficial effects on TMPHF poisoning thorough noncholinesterase and even noncholinergic mechanisms (Draganov et al., 1992). Their antidotal properties probably arise from their antimuscarinic, ganglion blocking and postjunctional nondepolarizing action. Although have not been shown to be any more efficacious than other H-oximes, particularly HI-6, the study of them gives additional useful information for possibilities of contracting the OPC poisoning.

a trachey anestetizovaných zvířat. Nervosvalový preparát obsahující m. tibialis ant. a n. ischiadicus byl připraven podle již dříve popsaného postupu (Samnalliev a spol., 1985). Byla registrována (Ugo Basile) amplituda kontrakcí holenního svalu po stimulaci ischiadického nervu. Zvířata premedikovaná atropinem v dávce 5 mg/kg byla intoxikována 180 µg/kg somanu (10LD<sub>100</sub>), což vedlo ke 100% blokadě neuromuskulárního přenosu vzruchu (NMT) během 5 minut. Oximy byly podávány 1 minutu po úplné blokadě přenosu. Všechny zkoušené sloučeniny obnovily neuromuskulární funkci, i když s rozdílnou účinností - nejnížší dávka, která vedla ke 100% obnově přenosu, byla v rozmezí od 3 do 50 mg/kg pro příslušné oximy a odpovídající doba na úplnou obnovu se pohybovala mezi 3-15 minutami. Při dávce 20 mg/kg byla nejúčinnější sloučeninou BDB 37 (obr. 6).

### 3. Účinek léčby oximem na respiraci a krevní tlak po intoxikaci TMPHF

Experimentální zvířata (kočky, potkani kmene Wistar) byla připravena pro záznam respirace a krevního tlaku postupem uvedeným již výše. Soman byl podáván i. v. v dávce 12 µg/kg (LD<sub>50</sub>), a i. m. v dávce 80 µg/kg (1,5 LD<sub>50</sub>) kočkám a potkanům. U kočky byl po intoxikaci TMPHF pozorován rychlý vývoj selhání respirace a srdeční činnosti. Léčba oximem (20 mg/kg podávaných i. v. 1 minutu po TMPHF) byla bez jakéhokoli terapeutického vlivu na depresivní účinek jedu. Po intoxikaci 1,5 LD<sub>50</sub> somanu šest z osmi potkanů exitovalo během první hodiny. Léčba oximem (HGG 42 nebo BDB 37, v dávce 20 mg/kg i. m. 3 minuty po TMPHF) nepůsobila žádné významné změny krevního tlaku ani tepové frekvence v porovnání s neléčenými zvířaty (obr. 7), ale znatelně prodloužila dobu přežití - 3 z 6 zvířat léčených oximem přežila po podání somanu 60 minut.

## Závěry

Oximy HGG a BDB nemohou reaktivovat AChE inhibovanou somanem in vivo (Draganov a spol., 1991), ale mají při této intoxikaci některé terapeutické účinky prostřednictvím necholinesterázových a dokonce i necholinergních mechanismů (Draganov a spol., 1992). Jejich antidotní vlastnosti jsou pravděpodobně dány anti-muskarinovým, ganglia blokujícím a postsynaptickým nedepolarizujícím účinkem. Ačkoli nebylo prokázáno, že by byly účinnější než ostatní H-oximy, zejména HI-6, jejich studium poskytuje další užitečné informace o možnostech antidotního působení proti otravě OF.

Překlad Ing. Rudolf Rychlý, CSc.  
VLA JEP Hradec Králové

## References

1. AMITAL, G. - KLOOG, Y. - BALDERMAN, D. - SOKOLOVSKY, M.: The interaction of bis-pyridinium oximes with mouse brain muscarinic receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 1980, p. 483-488.
2. CHRISTOVA, N. - PETROVA, I. - MANOLOVA, E.: Synthesis of HGG- and BDB- cholinesterase reactivators. Jubilee conference, 25-26 March 1993, Russe, Bulgaria.
3. DRAGANOV, D. - PETROVA, I. - SAMNALIEV, I.: Synthesis and antidotal properties of three bis-quaternary pyridinium salts. Proceedings of 8-th Conference of young scientists on organic and bioorganic chemistry. Riga, Latvia, 1991, p. 192.
4. DRAGANOV, D. - DISHOVSKI, CH. - YANEV, S.: Effect of OPC intoxication and therapy with atropine/cholinesterase reactivators on the detoxifying functions of organism. 2nd National Pharmacy Congress, 8- 10 October 1992, Sofia, Bulgaria, p. 189.
5. JANOVIC, D.: The effect of bis-pyridinium oximes on neuromuscular blockade induced by highly toxic organophosphates in rat. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 262, 1983, p. 231-241.
6. KIRSCH, D. - WEGER, N.: Effects of bispyridinium compounds HGG12, HGG42 and Obidoxime on synaptic transmission and NAD(P)H-fluorescence in the superior cervical ganglion of the rat in vitro. *Arch. Toxicol.*, 47, 1981, p. 217-232.
7. KLOOG, Y. - GARLON, M. - BALDERMAN, D. - SOKOLOVSKY, M.: Reversible and irreversible inhibition of rat brain muscarinic receptors is related to different substitutions on bisquaternary pyridinium oximes. *Arch. Toxicol.*, 58, 1985, p. 37-39.
8. LITCHFIELD, J. - WILCOXON, F.: A simplified method of evaluating dose- effect experiment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 95, 1949, p. 99-115.
9. MAXIMOVIC, M. - BOSCOVIC, B. - RADOVIC, L. - TADIC, V. - BINENFELD, Z.: Antidotal effect of bis- pyridinium- 2- monooxime carbonyl derivatives in intoxication with highly toxic organophosphorus compounds. *Acta Pharm. Yugosl.*, 30, 1980, p. 151-160.
10. ROUSSEAU, C. - Dua, A.: Pharmacology of HI-6, an H-series oxime. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 67, 1989, p. 1183- 1189.
11. SAMNALIEV, I. - DISHOVSKI, CH. - PETROVA, I.: Reversal of neuromuscular transmission after soman poisoning. 2nd Conference of young scientists. April 28, 1986, Sofia, Bulgaria.
12. SKRINJARIC-SPOLJAR, M. - KRALJ, M.: Reactivating and protective effects of pyridinium compounds in human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by organophosphates in vitro. *Arch. Toxicol.*, 45, 1980, p. 21-27.
13. WEGER, N. - SZINICZ, L.: Therapeutic effects of new oximes, Benactasine and Atropine in soman poisoning: Part I. Effects of various oximes in soman, sarin, and Vx poisoning in dogs. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1, 1981, p. 161-163.

Key words: Reactivators of ACHE; HGG- and BDB- oximes; Soman; Antidotal effects.

Klíčová slova: Reaktivátory ACHE; HGG a BDB oximy; Soman; Antidotní účinky.

Do redakce došlo 25. 5. 1993