

356.33:615.9-092.9

## VLIV FARMAKOLOGICKÉ PROFYLAXE PANPALEM NA REAKTIVAČNÍ ÚČINNOST OBIDOXIMU VŮČI FOSDRINEM INHIBOVANÉ ACETYLCHOLINESTERÁZE V KRVÍ, BRÁNICI A RŮZNÝCH ČÁSTECH MOZKU POTKANA

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

### Úvod

Nejužívanější skupinou pesticidů v zemědělství i domácnostech jsou ve světě organofosforové insekticidy (OFI), které nahradily dříve používané chlorované insekticidy především z důvodu absence kumulativního efektu na teplokrevné organismy a vysoké míry biodegradace v terénu (5, 11). Tato skupina insekticidů je vysoce toxická vůči hmyzu, ale může vyvolat i závažné intoxikace u lidí z důvodu neopatrné manipulace, nešťastné náhody či sebevražedného úmyslu (7, 11).

Mezi nejtoxickejší OFI patří fosdrin (Mevinfos, 0,0-dimethyl-0-/1-carbomethoxyvinyl/ fosfát), který se používá k ničení much v uzavřených místnostech, proti hmyzu ohrožujícímu kulturní plodiny a v boji proti ekto- a endoparazitům domácích užitkových zvířat (7, 11).

Přes znalost základního mechanismu účinku organofosforových (OF) sloučenin není stále efekt antidotní terapie, skládající se z anticholinergik a reaktivátorů acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) uspokojivý (4, 17). Pro terapii akutních otrav OFI je z anticholinergik nejčastěji používán atropin s periferním antimuskarinovým účinkem, z reaktivátorů AChE obidoxim, který je t. č. jediným dostupným oximem v České republice (4, 21). Obidoxim je sice poměrně málo účinný při terapii akutních intoxikací vysoce toxickými OF sloučeninami, ale pro terapii akutních otrav OFI je stále považován za jednoho z neúčinnějších reaktivátorů AChE (12, 15, 21).

Jednou z cest, jak zvýšit efekt antidotní terapie, může být použití farmakologické profylaxe, která zvyšuje odolnost exponovaného organismu vůči účinkům OF sloučenin. Základem farmakologické profylaxe je karbamát pyridostigmin (PST), reverzibilní inhibitor AChE schopný ochránit část AChE před ireverzibilní inhibicí OF sloučeninami. Spontánní dekarbamylace v průběhu otravy poskytne dostatek funkční AChE k obnově cholinergního přenosu nervového vzruchu (2, 3, 19). Profylaktický účinek PST je však poměrně krátkodobý a slabý (18, 23). Zdá se proto výhodné kombinovat v rámci profylaxe účinek PST s anticholinergiky, která by mohla přispět k eliminaci nežádoucích účinků PST a k prodloužení a zesílení efektu profylaxe (2, 21). Jednou z takových možností je kombinace PST s

anticholinergiky benaktyzinem (BNZ) a trihexyfenidylem (THF), nazvaná PANPAL, která je originálním řešením farmakologické profylaxe otrav OF sloučeninami vyvinutým na našem pracovišti (2, 16, 21).

Při použití farmakologické profylaxe a následné intoxikaci OFI je třeba vzít v úvahu, že AChE je postupně vystavena dvěma inhibitorům - reverzibilnímu v rámci profylaxe (PST) a ireverzibilnímu v rámci intoxikace (OFI). Cílem této práce je zjistit, jak profylaxe Panpalem ovlivní aktivitu AChE v krvi, bránici a různých částech mozku potkana v průběhu neléčené intoxikace i intoxikace léčené obidoximem v kombinaci s atropinem.

### Materiál a metody

Jako pokusná zvířata byli použiti samci bílého potkana kmene Wistar chovu Konárovice o hmotnosti 190-210 g, kteří byli krmeni standardní Larsenovou dietou a vodou ad libitum. Skupinám po 6 zvířatech byl fosdrin podáván intramuskulárně (i. m.) v subletální dávce 0,40 mg/kg odpovídající 75 % námi zjištěné hodnoty LD<sub>50</sub> (13). Vybraným skupinám potkanů byl 60 minut před intoxikací podáván perorální sondou Panpal (PST v dávce 5,82 mg/kg v kombinaci s BNZ v dávce 70 mg/kg a THF v dávce 16 mg/kg). Některé skupiny potkanů byly za 30 sekund po intoxikaci léčeny i. m. obidoximem (35,9 mg/kg) v kombinaci s atropinem (21 mg/kg).

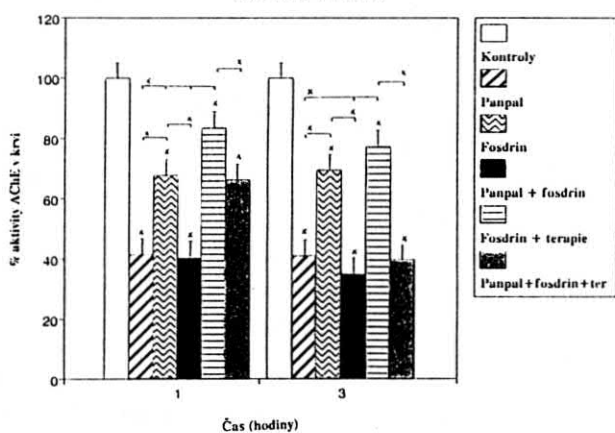
Za 1 či 3 hodiny po intoxikaci byli potkaní usmrceni dekapitací a byla jim odebrána krev, bránice a mozek, ze kterého byly po zmrazení na suchém ledu vyjmuty frontální kůra, pontomedulární oblast, hippocampus a mozeček. Aktivita AChE v krvi a tkáních byla stanovována spektrofotometrickou metodou podle Ellmana a spol. (6) na spektrofotometru UVIKON 942 firmy Canberra-Packard.

Aktivita AChE byla měřena v  $\mu$ mol hydrolyzovaného substrátu acetylthiocholinu na g vlhké tkáně nebo ml plné krve a minutu a vyjadřována v procentech kontrolních hodnot získaných od kontrolních zvířat, kterým byl místo Panpalu, noxy a léčiv podáván fyziologický roztok ve stejném objemu (0,1 ml/100 g hmotnosti). Naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány pomocí analýzy rozptylu a v případě signifikantního rozdílu na 95% hladině významnosti ( $p < 0,05$ ) dále hodnoceny Sheffeho kontrastem (1).

### Výsledky

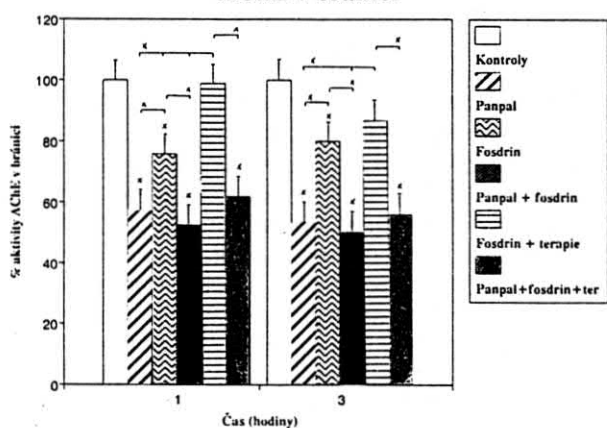
Vliv profylaxe Panpalem na vývoj aktivity AChE v plné krvi v průběhu neléčené i léčené intoxikace fosdrinem je znázorněn na obr. 1. Samotný Panpal způsobuje více než 50% snížení aktivity krevní AChE ( $p < 0,05$ ) a pokud po Panpalu následuje intoxikace fosdrinem, dochází ke statisticky významnému prohloubení fosdrinem vyvolané inhibice AChE ( $p < 0,05$ ). Panpal také statisticky významně snižuje reaktivaci fosdrinem inhibované krevní AChE vyvolanou obidoximem, a to v obou sledovaných časových intervalech ( $p < 0,05$ ) (obr. 1).

#### AChE v krvi



Obr. 1 Změny aktivity AChE v krvi po p. o. profylaxi Panpalem, i. m. intoxikaci fosdrinem a následné i. m. terapii obidoximem v kombinaci s atropinem. Statistická významnost:  $x = p < 0,05$ .

#### AChE v bránici



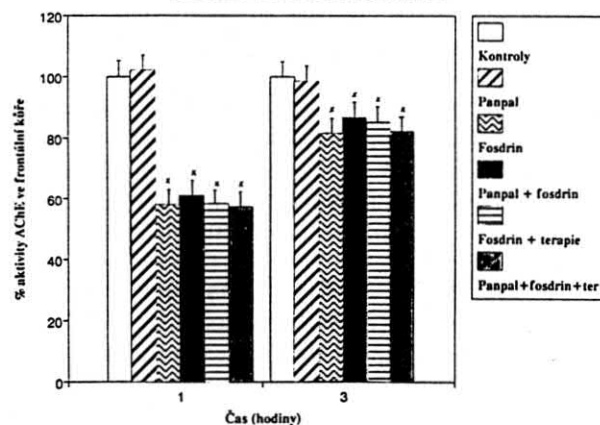
Obr. 2 Změny aktivity AChE v bránici po p. o. profylaxi Panpalem, i. m. intoxikaci fosdrinem a následné i. m. terapii obidoximem v kombinaci s atropinem. Statistická významnost viz obr. 1.

Podobné výsledky byly zaznamenány i v bránici, jak dokumentuje obr. 2. Opět samotný Panpal snížil aktivitu brániční AChE o téměř 50 % ( $p < 0,05$ ) a v případě následné intoxikace potkanů fosdrinem

prohloubil OFI vyvolanou inhibici brániční AChE o 23-30 % kontrolních hodnot ( $p < 0,05$ ). Velmi výrazně též ovlivnil Panpal reaktivační účinek obidoximu na fosdrinem inhibovanou brániční AChE, který prakticky eliminoval ( $p < 0,05$ ) (obr. 2).

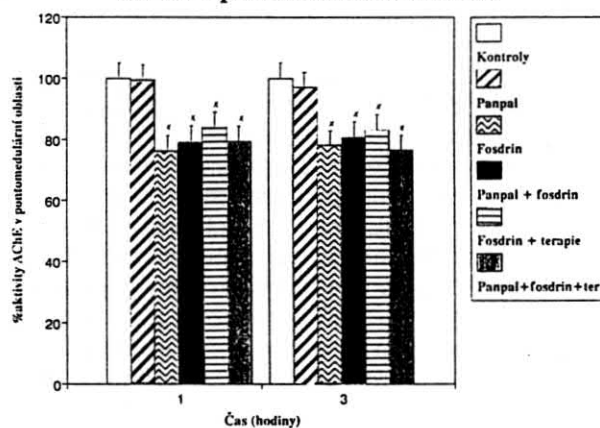
Vliv profylaxe Panpalem na vývoj aktivity AChE ve sledovaných částech mozku je znázorněn na obr. 3-6. Ve všech vybraných částech mozku samotný Panpal vůbec neovlivnil aktivitu mozkové AChE stejně jako fosdrinem vyvolanou inhibici mozkové AChE v případě neléčené intoxikace experimentálních zvířat. Nedošlo ani k signifikantnímu ovlivnění reaktivační účinnosti obidoximu Panpalem, jež byla sama o sobě statisticky nevýznamná bez ohledu na sledovanou část mozku. Panpal tedy v CNS na rozdíl od periférie nezasáhl ani do fosdrinem vyvolané inhibice AChE, ani do reaktivačního efektu obidoximu (obr. 3-6).

#### AChE ve frontální kůře

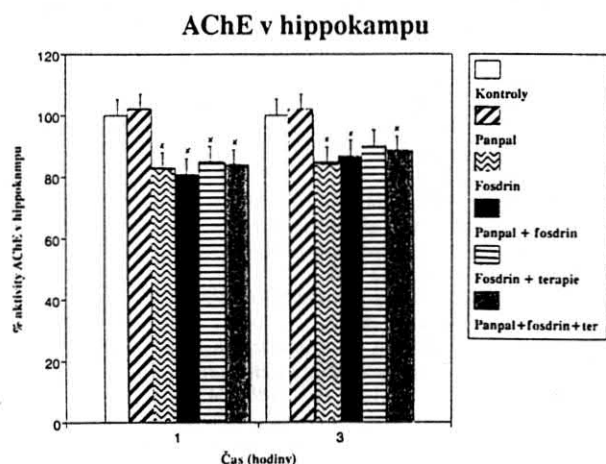


Obr. 3 Změny aktivity AChE ve frontální kůře po p. o. profylaxi Panpalem, i. m. intoxikaci fosdrinem a následné i. m. terapii obidoximem v kombinaci s atropinem. Statistická významnost viz obr. 1.

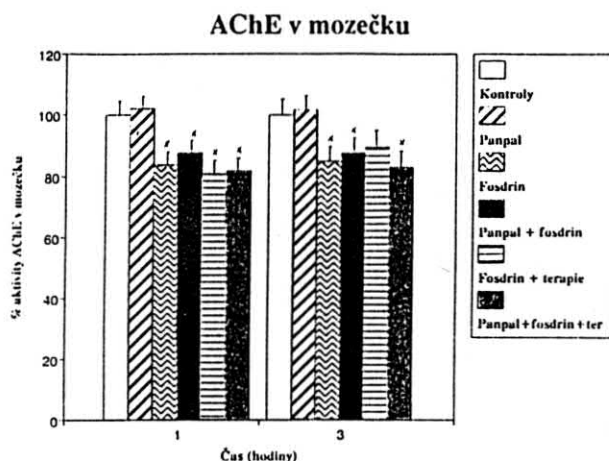
#### AChE v pontomedulární oblasti



Obr. 4 Změny aktivity AChE v pontomedulární oblasti po p. o. profylaxi Panpalem, i. m. intoxikaci fosdrinem a následné i. m. terapii obidoximem v kombinaci s atropinem. Statistická významnost viz obr. 1.



Obr. 5 Změny aktivity AChE v hippocampu po p. o. profylaxi Panpalem, i. m. intoxikaci fosdrinem a následně i. m. terapii obidoximem v kombinaci s atropinem. Statistická významnost viz obr. 1.



Obr. 6 Změny aktivity AChE v mozečku po p. o. profylaxi Panpalem, i. m. intoxikaci fosdrinem a následně i. m. terapii obidoximem v kombinaci s atropinem. Statistická významnost viz obr. 1.

### Diskuse

Ve světě rozšířené používání OFI přináší s sebou relativně časté nebezpečí intoxikací těmito noxami. Navíc opakovaná expozice OFI může vést k hepatotoxicitě (24), poruchám nervosvalové dráždivosti (9) a k mutagenitě či teratogenitě (8, 22). Je proto důležité najít bezpečný způsob zvýšení odolnosti rizikových osob, které přicházejí pravidelně do kontaktu s OFI, jako jsou někteří pracovníci v zemědělství a piloti práškovacích letadel, zvláště když je známo, že terapeutická účinnost dosud používaných antidot není vůči OF sloučeninám včetně OFI stále uspokojivá (21). Nelze totiž vyloučit ani dlouhodobé následky opakovaných expozic nízkým dávkám OFI (20).

Opakovaně bylo prokázáno, že podávání kombinovaného profylaktika Panpalu způsobuje zjevné zvýšení odolnosti organismu vůči toxickým účinkům jak vysoce toxických OF sloučenin, tak OFI, o čemž svědčí statisticky významné zvýšení hodnoty  $LD_{50}$  OF sloučenin po profylaxi Panpalem ve srovnání s hodnotami  $LD_{50}$  neovlivněné intoxikace (2, 13, 16). Příčinou tohoto efektu je především karbamylace AChE pyridostigminem, která snižuje fosforylační kapacitu AChE pro OF sloučeniny. K inhibici stejného množství AChE je potom nutná vyšší koncentrace OF sloučeniny, jak bylo prokázáno pokusy in vitro (19).

Na druhé straně musíme počítat s tím, že v případě profylaxe intoxikace Panpalem může dojít k přechodnému prohloubení poklesu aktivity AChE v důsledku současného nebo následného působení dvou inhibitorů AChE - reverzibilního (PST v profylaxi) a ireverzibilního (OFI), jak ostatně prokázaly i výsledky této práce. Navíc může dojít vlivem prohloubení poklesu aktivity AChE působením obou inhibitorů i ke snížení reaktivačního účinku reaktivátoru AChE ve srovnání s léčenou intoxikací bez profylaxe, což bylo též pozorováno i v této práci, ale pouze na periférii, neboť hematoencefalická bariéra (HEB) zřejmě zabraňuje penetraci PST, obsahujícího kwarterní dusík, do CNS (2, 14). Je-li však organismus současně vystaven dlouhodobému intenzivnímu stresu, může dojít ke změně propustnosti HEB a k zásahu PST i v CNS (10). Proto pokládáme za velmi důležité již v rámci profylaxe kombinovat PST s anticholinergiky, která alespoň částečně eliminují důsledek přechodného poklesu aktivity AChE - akumulaci acetylcholinu na cholinergních synapsích.

### Souhrn

V pokusech na samcích potkana byl sledován vliv farmakologické profylaxe Panpalem (pyridostigmin v kombinaci s benaktyzinem a trihexyfenidylem) na aktivitu acetylcholinesterázy v plné krvi, bránici a vybraných částech mozku (frontální kůra, pontomedulární oblast, hippocampus, mozeček) v 1. a 3. hodině neléčené a léčené (obidoximem v kombinaci s atropinem) intoxikace organofosforovým insekticidem fosdrinem.

Zatímco v CNS nedošlo vlivem Panpalu ke statisticky významným změnám aktivity acetylcholinesterázy v průběhu neléčené i léčené intoxikace fosdrinem, v krvi a bránici Panpal výrazně prohloubil fosdrinem vyvolanou inhibici aktivity acetylcholinesterázy a navíc snížil reaktivační efekt obidoximu. Tyto údaje svědčí o důležitosti kombinace v profylaxi užívaného reverzibilního inhibitoru acetylcholinesterázy pyridostigminu s anticholinergiky, které by mohly eliminovat důsledky pyridostigminem vyvolaného poklesu aktivity enzymu na periférii.

## Poděkování

Autor děkuje paní J. Petrové, J. Uhlířové a M. Zechovské za technickou spolupráci a Mgr. V. Bláhovi za pomoc při statistickém zpracování výsledků.

## Literatura

1. AFIFI, AA. - AZEN, SP.: Statistical Analysis and Computer Oriented Approach. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1979. 442 p.
2. BAJGAR, J. - FUSEK, J. - VACHEK, J.: Treatment and prophylaxis against nerve agent poisoning. ASA Newslett., 1994, vol. 94, no. 4, p. 10-11.
3. BRODBECK, U. - GENTINETTA, R.: Inhibition of blood acetylcholinesterase after single and repeated doses of pyridostigmine. Proceedings CBW Medical Treatment Symposium, 5-8 December 1994, Spiez, Švýcarsko, p. 16.
4. DAWSON, RM.: Review of oxime available for treatment of nerve agent poisoning. J. appl. Toxicol., 1994, vol. 14, no. 5, p. 317-331.
5. DIKSHITH, TSS.: Pesticides. In: Toxicology of Pesticides in Animals. Ed. TSS. Dikshith, CRC Press, Boca Raton, 1991. 285 p.
6. ELLMAN, GL., et al.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., 1961, vol. 7, p. 88-95.
7. FEST, C. - SCHMIDT, KJ.: The chemistry of organophosphorus pesticides. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin, Springer-Verlag, 1982. 360 p.
8. FLESSEL, P. - QUINTANA, PJG. - HOOPER, K.: Genetic toxicity of malathion: a review. Environ. mol. Mutagen., 1993, vol. 22, p. 7-17.
9. GOOD, JL., et al.: Pathophysiological studies of neuromuscular function in subacute organophosphate poisoning induced by phosmet. J. Neurol. Neurosurg. Psych., 1993, vol. 56, p. 290-294.
10. HANIN, I.: The Gulf War, stress and a leaky blood-brain barrier. Nature Med., 1996, vol. 2, p. 1307-1308.
11. CHAMBERS, HW.: Organophosphorus compounds: An overview. In Chambers, JE., Levi, PE. (Eds.). Organophosphates Chemistry, Fate and Effects. San Diego, Academic Press, 1992. 218 p.
12. KASSA, J.: Srovnání účinnosti antidotních směsí proti akutní intoxikaci organofosforovými insekticidy u myši. Pracov. Lék., 1996, roč. 48, s. 55-58.
13. KASSA, J.: Vliv Panpalu na terapeutickou účinnost antidotní kombinace HI-6 s benaktyzinem u akutní otravy potkana fosdrinem nebo trichlorfonem. Voj. zdrav. Listy, 1996, roč. 65, č. 4, s. 169-172.
14. KASSA, J.: Vliv farmakologické profylaxe Panpalem na aktivitu acetylcholinesterázy v bránici a různých částech mozku potkana v průběhu neléčené a léčené intoxikace somanem. Čas. Lék. čes., 1998, roč. 137, č. 10, s. 299-302.
15. KASSA, J. - BAJGAR, J.: Srovnání terapeutické účinnosti vybraných reaktivátorů cholinesteráz s atropinem u akutní intoxikace myši fosdrinem. Čes. Slov. Farm., 1996, roč. 45, č. 1, s. 31-34.
16. KASSA, J. - BAJGAR, J.: The influence of pharmacological pre-treatment on efficacy of HI-6 in combination with benactyzine in soman poisoning in rats. Hum. exp. Toxicol., 1996, vol. 15, p. 383-388.
17. MARRS, TC.: Organophosphate poisoning. Pharm. Ther., 1993, vol. 58, p. 51-66.
18. MAXWELL, DM., et al.: Comparison of antidote protection against soman by pyridostigmin, HI-6 and acetylcholinesterase. J. Pharmacol. exp. Ther., 1992, vol. 264, no. 3, p. 1085-1089.
19. PATOČKA, J.: Effect of pyridostigmine and syntostigmine pretreatment on the inhibition of acetylcholinesterase by pinacolyl methylphosphonofluoridate. In vitro experiments with rat tissues. Biomed. Biochem. Acta, 1989, vol. 48, p. 715-720.
20. RICHTER, ED., et al.: Health effects from exposure to organophosphate pesticides in workers and residents in Israel. Isr. J. med. Sci., 1992, vol. 28, p. 584-597.
21. VACHEK, J., et al.: Novější způsoby léčby intoxikace organofosfáty. Sbor. věd. Práci VLA JEP Hradec Králové, 1993, roč. 116, s. 67-95.
22. VILLAR, D. - LI, MH. - SCHAEFFER, DJ.: Toxicity of organophosphorus pesticides to Dugesia Dorotocephala. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1993, vol. 51, p. 80-87.
23. WALDAY, DM., et al.: Effect of pyridostigmine pretreatment, HI-6 and Toxogonin treatment on rat tracheal smooth muscle response to cholinergic stimulation after organophosphorus inhalation exposure. Arch. Toxicol., 1993, vol. 67, p. 212-219.
24. YAMANO, T. - MORITA, S.: Hepatotoxicity of trichlorfon and dichlorvos in isolated rat hepatocytes. Toxicology, 1992, vol. 78, p. 69-77.

Klíčová slova: Fosdrin; Panpal; Obidoxim; Atropin; Krev; Bránice; Mozek; Acetylcholinesteráza; Potkan.

Do redakce došlo 4. 2. 1999