

615.7-099-08:623.459.46:615.525

VLIV L-CARNITINU NA CENTRÁLNÍ REAKTIVAČNÍ ÚČINEK OXIMU HI-6 PŘI ANTIDOTNÍ TERAPII INTOXIKACE SOMANEM U POTKANA

Jiří KASSA, Josef HERINK

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

Souhrn

V pokusech na samcích potkana byl studován vliv L-carnitinu, o němž je známo, že usnadňuje penetraci některých chemických látek přes biologické bariéry, na centrální reaktivační účinek oximu HI-6 v průběhu léčené akutní intoxikace vysoce toxickým organofosfátem somanem.

Vliv L-carnitinu na centrální reaktivační efekt oximu HI-6 byl hodnocen cestou srovnání aktivity acetylcholinesterázy v erythrocytech, bránici a různých částech mozku u potkanů intoxikovaných somanem a léčebných kombinací oximu HI-6 s atropinem, kterým byl 30 nebo 60 minut před vlastní intoxikací perorálně či intraperitoneálně podán L-carnitin v různých dávkách, vůči potkanům bez profylaxe L-carnitinem. Aktivita acetylcholinesterázy byla měřena 30 minut po intoxikaci.

Dosažené výsledky prokázaly, že L-carnitin není schopen ve sledovaných dávkách a způsobech podání statisticky významně ovlivnit reaktivační účinek oximu HI-6 v CNS při terapii otravy somanem a že se tedy nehodí k profylaxi otrav organofosforovými sloučeninami.

Klíčová slova: Soman; L-carnitin; Oxim HI-6; Atropin; Acetylcholinesteráza; Potkan.

The Influence of L-Carnitine on the Central Reactivating Efficacy of the Oxime HI-6 during the Antidotal Treatment of Poisoning with Soman in Rats

Summary

The influence of L-carnitine, which is known to enhance the penetration of some chemical compounds through the biological barrier, on the central reactivating efficacy of the oxime HI-6 was studied in rats poisoned with highly toxic organophosphate soman.

The influence of L-carnitine on the central reactivating effects of the oxime HI-6 was evaluated through a comparison of acetylcholinesterase activity in erythrocytes, the diaphragm and various parts of the brain in rats poisoned with soman and treated with the oxime HI-6 and atropine that were perorally or intraperitoneally pretreated with L-carnitine at various doses with the non-pretreated rats. The activity of acetylcholinesterase was measured 30 min following soman challenge.

Our results show that L-carnitine is not able to significantly influence the reactivating efficacy of the oxime HI-6 in soman-poisoned rats regardless of the dose and route of administration. Thus, L-carnitine is not suitable for the pretreatment of poisonings with organophosphorous compounds.

Key words: Soman; L-carnitine; Oxime HI-6; Atropine; Acetylcholinesterase; Rat.

Úvod

Přes dobrou znalost mechanismu toxického účinku organofosforových (OF) sloučenin – narušení cholinergního přenosu nervového vzruchu cestou akumulace neuromediátoru acetylcholinu na periferních i centrálních cholinergních synapsích v důsledku ireverzibilní inhibice enzymu acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) (22, 24) – není antidotní terapie akutních intoxikací vysoce toxickými OF sloučeninami

nami skládající se z reaktivátorů AChE a anticholinergik dostatečně účinná (2, 9).

Výzkum antidotní terapie akutních intoxikací OF sloučeninami je zaměřen především na terapii akutní intoxikace somanem (O-pinakolyl methylfluorofosfonát), neboť akutní toxické účinky somanu patří mezi nejhůře léčitelné. Důvodem je především rychlá dealkylace komplexu enzym-inhibitor znemožňující nukleofilní účinek reaktivátorů AChE a možnost následného uvolňování somanu z depot-

ních míst s rizikem reinhibice již jednou inhibované a následně reaktivované AChE (2, 11, 15). Podle dosavadních experimentálních zkušeností se jako dosud nejúčinnější reaktivátor AChE při terapii akutních intoxikací somanem jeví oxim HI-6 (9, 16, 18, 19). Jeho terapeutický efekt je dán nejen reaktivací somanem inhibované AChE, ale i jinými, přímými farmakologickými účinky, jako jsou ganglion blokující či antimuskarinový efekt (25). Nevýhodou oximu HI-6 je jeho nižší centrální efekt ve srovnání s efektem periferním z důvodu obtížné penetrace oximu HI-6 přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Nižší centrální efekt oximu HI-6 se projevuje především nižší reaktivační účinností v CNS ve srovnání s periférií (4, 8, 17).

Jednou z možností, jak zvýšit centrální účinek oximu HI-6, je přidání sloučeniny umožňující jiným látkám snazší přechod přes HEB. Mezi takové látky patří i L-carnitin (3-hydroxy-4-N-trimethylamino-butyrát), který tvoří přirozenou součást savčích tkání (3). Jako přepravce mastných kyselin přes mitochondriální membrány umožňuje beta oxidaci volných mastných kyselin, a zasahuje tak do energetického metabolismu (5). L-carnitin je považován za jednu ze sloučenin usnadňující a zvyšující penetraci nejrůznějších chemických sloučenin přes biologické bariéry včetně HEB (3).

Cílem této práce je prověřit možný pozitivní efekt L-carnitinu na centrální účinek oximu HI-6 při terapii potkanů intoxikovaných somanem cestou sledování reaktivačního efektu oximu HI-6 v CNS a na periférii.

Materiál a metody

Jako pokusná zvířata byli použiti samci bílých potkanů kmene Wistar chovu Konárovice o hmotnosti 180–210 g, kteří byli krmeni Larsenovou dietou a napájeni vodou ad libitum. Vlastní pokusy byly prováděny na 9 skupinách po 6 zvířatech.

Všem skupinám byl soman podáván intramuskulárně (i. m.) v dávce odpovídající námi zjištěné hodnotě LD_{50} – 60 μ g/kg tělesné hmotnosti (16). Jako kontrolní byla označena *první skupina* potkanů (A), které byl místo somanu a léčiv podáván fyziologický roztok ve stejném objemu (0,1 ml/100 g tělesné hmotnosti). *Druhá skupina* pokusných laboratorních zvířat (B) byl za 1 minutu po intoxikaci podán i. m. atropin v dávce 21 mg/kg. *Třetí skupina* potkanů (C) byla 1 minutu po intoxikaci léčena kom-

binací atropinu v dávce 21 mg/kg a oximu HI-6 v dávce 37,7 mg/kg (100 μ mol/kg). *Čtvrté až deváté skupině* pokusných zvířat byl před intoxikací somanem podán L-carnitin, přičemž terapie těchto potkanů byla vždy stejná jako ve třetí skupině (kombinace atropinu s oximem HI-6). L-carnitin byl podáván buď perorálně, nebo intraperitoneálně. Perorálně byl L-carnitin podáván v dávce 250 mg/kg 30 minut (*skupina 4 – D*) nebo 60 minut před intoxikací somanem (*skupina 5 – E*) nebo v dáce 650 mg/kg 30 minut (*skupina 6 – F*) či 60 minut před intoxikací (*skupina 7 – G*). Intraperitoneálně byl L-carnitin vždy podáván v dávce 250 mg/kg, a to buď 30 minut (*skupina 8 – H*) nebo 60 minut před intoxikací (*skupina 9 – I*).

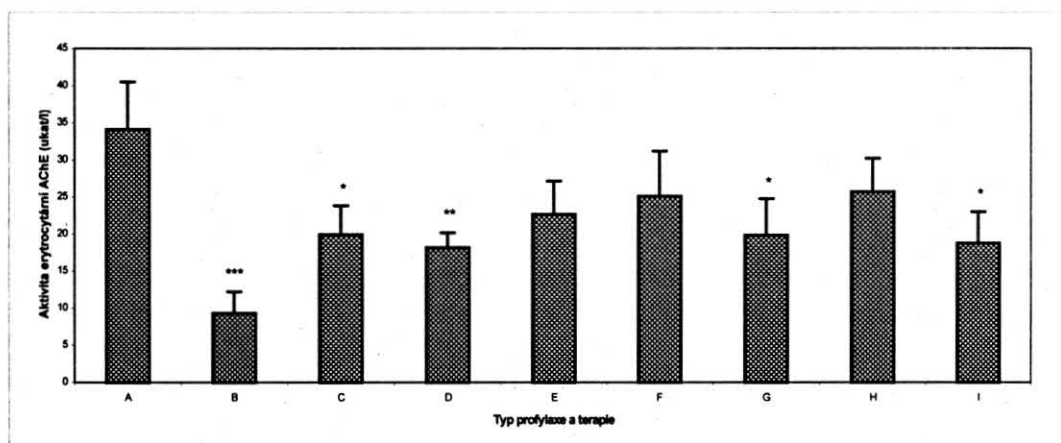
Za 30 minut po intoxikaci byly všechny skupiny pokusných zvířat usmrceny dekapitací a byla jim odebrána nesrážlivá krev, bránice a mozek. Z krve byly cestou centrifugace odděleny erytrocyty, z mozku byly po zmrazení na suchém ledu odděleny frontální kůra, pontomedulární oblast, mozeček a hippokampus. Aktivita AChE byla stanovována spektrofotometrickou metodou podle Ellmana a spol. (10) v μ kat/l nebo kg.

Statisticky byly získané výsledky hodnoceny pomocí analýzy rozptylu. V případě statisticky významných rozdílů mezi srovnávanými údaji na minimálně 95% hladině významnosti ($p < 0,05$) byly dále hodnoceny Scheffého kontrastem (1). Při grafickém znázornění výsledků jsou hodnoty aktivity AChE uváděny jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou průměru. Statistické zpracování výsledků bylo provedeno na Ústavu informací VLA JEP pomocí programu Statgraphics (verze 4.2).

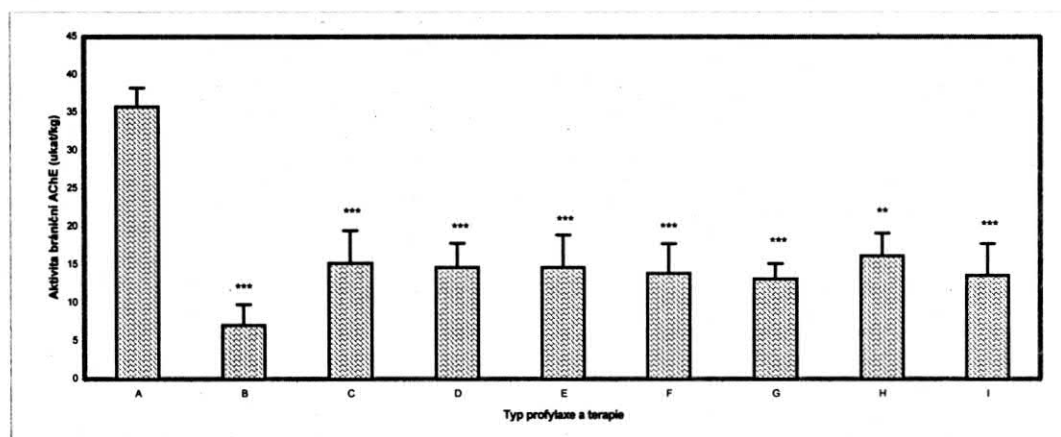
Výsledky

Změny aktivity somanem inhibované AChE na periférii (v erytrocytech a bránici) v závislosti na typu terapie a profylaxe jsou znázorněny na obr. 1–2. Zatímco podání oximu HI-6 společně s atropinem v rámci antidotní terapie otravy somanem vedlo v erytrocytech i bránici potkana ke vzestupu somanem inhibované aktivity AChE, jak ukazuje srovnání s terapií otravy samotným atropinem, přidání L-carnitinu před vlastní intoxikací v podstatě reaktivaci somanem inhibované AChE neovlivnilo bez ohledu na dávku, způsob a dobu podání L-carnitinu.

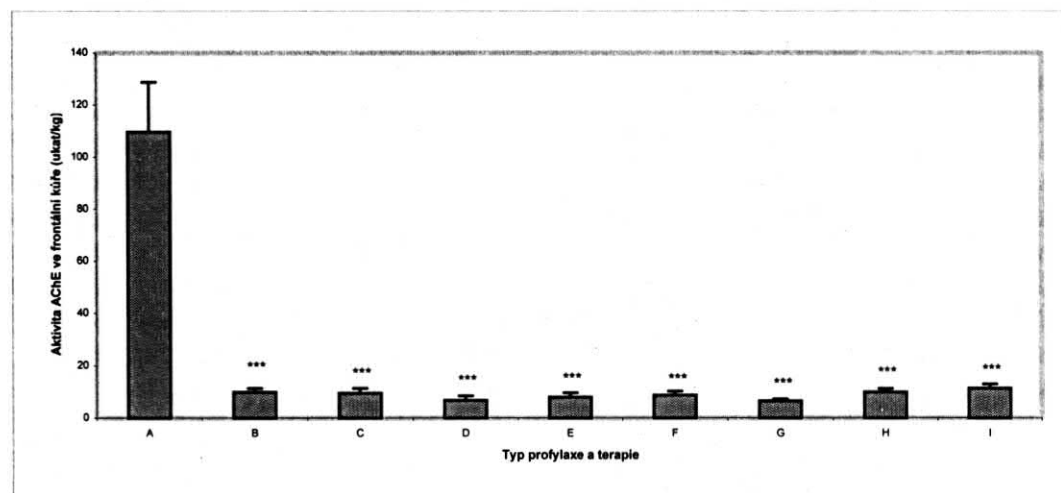
Změny aktivity somanem inhibované AChE v



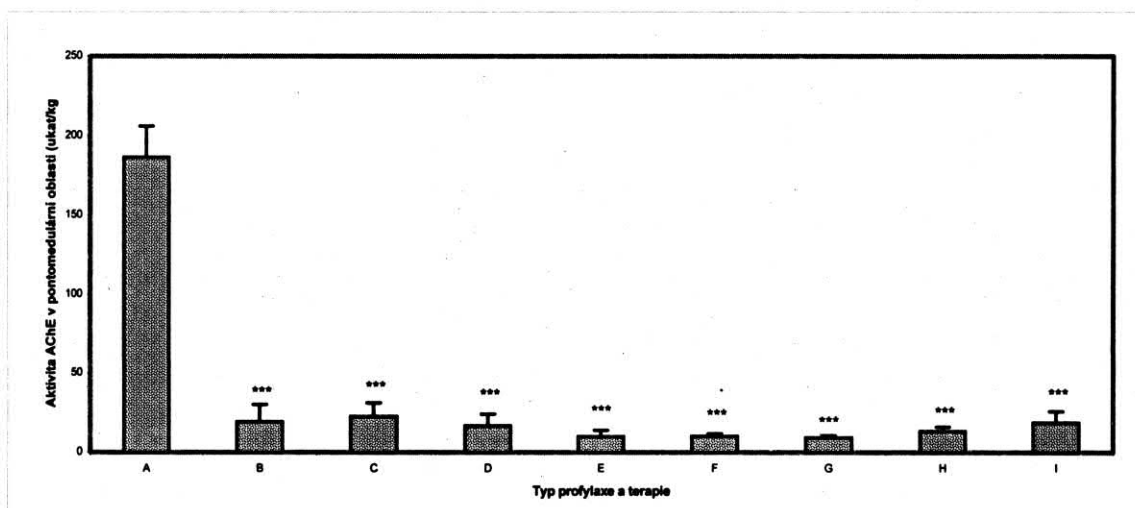
Graf 1: Změny aktivity AChE v erytrocytech potkana intoxikovaného somanem a léčeného oximem HI-6 s atropinem, kde A – kontrolní skupina, B – intoxikace somanem s následnou terapií atropinem, C – intoxikace somanem s následnou terapií oximem HI-6 s atropinem, D – intoxikace somanem s 30minutovou profylaxí L-carnitinem (250 mg/kg, p. o.) a následnou terapií oximem HI-6 s atropinem, E – intoxikace somanem s 60minutovou profylaxí L-carnitinem (250 mg/kg, p. o.) a následnou terapií oximem HI-6 s atropinem, F – intoxikace somanem s 30minutovou profylaxí L-carnitinem (650 mg/kg, p. o.) a následnou terapií oximem HI-6 s atropinem, G – intoxikace somanem s 60minutovou profylaxí L-carnitinem (650 mg/kg, p. o.) a následnou terapií oximem HI-6 s atropinem, H – intoxikace somanem s 30minutovou profylaxí L-carnitinem (250 mg/kg, i. p.) a následnou terapií oximem HI-6 s atropinem, I – intoxikace somanem s 60minutovou profylaxí L-carnitinem (250 mg/kg, i. p.) a následnou terapií oximem HI-6 s atropinem. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



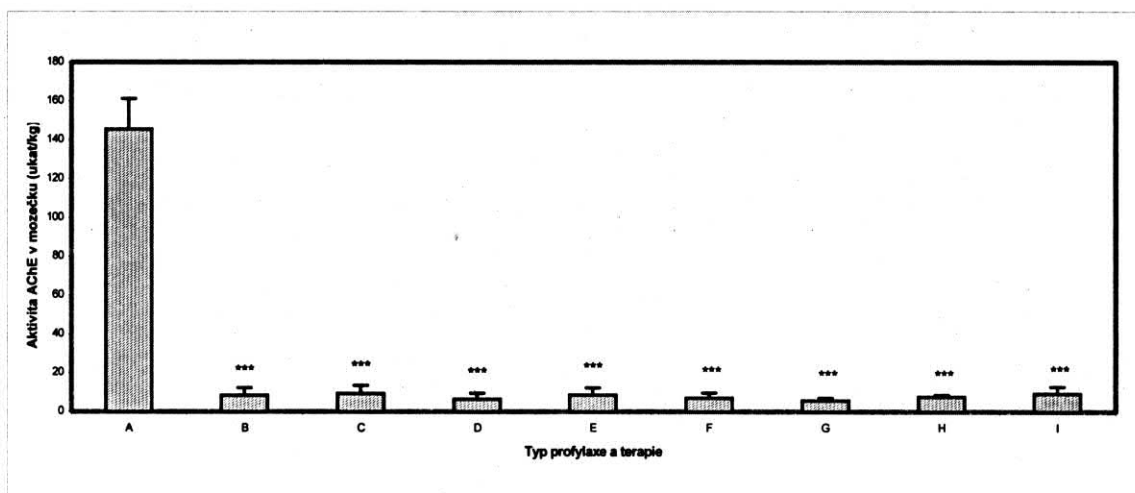
Graf 2: Změny aktivity AChE v ránici potkana intoxikovaného somanem a léčeného oximem HI-6 s atropinem. Symboly a statistická významnost viz graf 1.



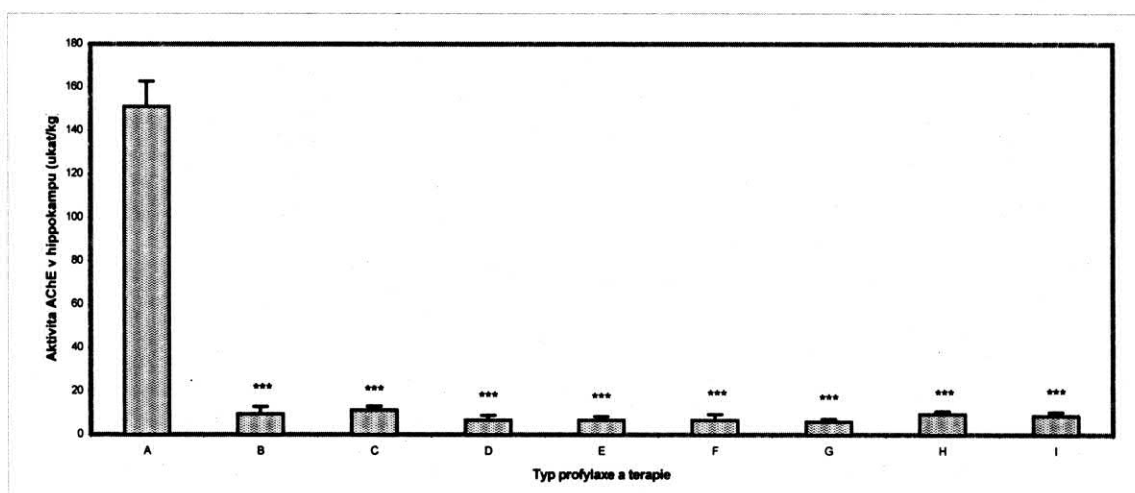
Graf 3: Změny aktivity AChE ve frontální kůře potkana intoxikovaného somanem a léčeného oximem HI-6 s atropinem. Symboly a statistická významnost viz graf 1.



Graf 4: Změny aktivity AChE v pontomedulární oblasti potkana intoxikovaného somanem a léčeného oximem HI-6 s atropinem. Symboly a statistická významnost viz graf 1.



Graf 5: Změny aktivity AChE v mozečku potkana intoxikovaného somanem a léčeného oximem HI-6 s atropinem. Symboly a statistická významnost viz graf 1.



Graf 6: Změny aktivity AChE v hippocampu potkana intoxikovaného somanem a léčeného oximem HI-6 s atropinem. Symboly a statistická významnost viz graf 1.

různých částech CNS (frontální kůra, pontomedulární oblast, mozeček, hippokampus) jsou znázorněny na obr. 3–6. Oxim HI-6 v CNS prakticky neovlivnil hodnotu aktivity AChE, byl-li podán společně s atropinem v rámci antidotní terapie otravy somanem bez ohledu na sledovanou oblast CNS. Stejně tak profylaktické podání L-carnitinu neovlivnilo reaktivační účinek oximu HI-6 ve sledovaných částech CNS bez ohledu na dávku, způsob a čas podání L-carnitinu.

Diskuse

Přes snahu civilizovaného světa jednou provždy skoncovat s hrozbou použití chemických zbraní není nebezpečí zneužití vysoce toxických OF sloučenin zažehnáno, jak ukázal příklad teroristického útoku v Japonsku (23). Proto je hlavním cílem výzkumu biologických účinků těchto vysoce toxických látek najít dostatečně účinnou terapii a profylaxi eliminující jejich akutní toxické projevy. To platí především pro akutní intoxikaci somanem, který je pokládán za nejobtížněji léčitelnou OF sloučeninu (16–19).

Soman v použité letální dávce (1 x LD₅₀) způsobil během 30 minut výraznou inhibici AChE klesající na periférii pod 30 % kontrolních hodnot, v CNS dokonce pod 15 % kontrolních hodnot, což dokazuje předpokládanou převahu centrálního účinku somanu vzhledem k jeho vysoké afinitě k CNS dané jeho lipofilním charakterem (6, 22). Přežití pokusných zvířat po dobu 30 minut po otravě do provedení dekapitace bylo zajištěno podáním atropinu. Přidání oximu HI-6 k atropinu v rámci antidotní terapie intoxikovaných potkanů vedlo k výrazné reaktivaci AChE na periférii (v erytrocytech a bránici), kde byl zaznamenán vzestup aktivity AChE na přibližně dvojnásobek ve srovnání s potkany léčenými samotným atropinem. Naopak ve sledovaných částech CNS vzestup aktivity AChE v potkanů léčených kombinací atropinu a oximu HI-6 ve srovnání s potkany léčenými samotným atropinem nebyl prokázán. To znamená, že centrální reaktivační účinek oximu HI-6 v použité dávce je minimální, zřejmě z důvodu obtížného přestupu přes HEB z důvodu přítomnosti kvarterního dusíku v molekule (7, 17, 20, 21).

Jedna z možností, jak zvýšit centrální reaktivační účinek oximu HI-6, je farmakologické ovlivnění jeho přestupu přes HEB. V této studii byla za tímto

účelem zkoušena látka L-carnitin, o níž je známo, že usnadňuje přestup jiných chemických látek přes biologické bariéry včetně HEB (3, 5). Již dříve byla experimentálně ověřena schopnost L-carnitinu zvýšit efekt centrálních analeptik, jako je pentamethylentetrazol (12, 13), a některých inhibitorů AChE, jako je takrin a jeho deriváty, především 7-methoxytakrin (14). Tato studie však pozitivní vliv L-carnitinu na centrální reaktivační efekt oximu HI-6 neprokázala, což znamená, že v případě oximu HI-6 se efekt L-carnitinu na přestup před HEB neuplatnil. Nebyl pozorován ani jiný mechanismus ovlivnění reaktivačního efektu oximu HI-6 L-carnitinem, jak ukazují výsledky vzájemného působení obou látek na periférii.

Závěrem lze konstatovat, že L-carnitin není vhodným doplňkem profylaxe či terapie akutních intoxikací OF sloučeninami, neboť není schopen pozitivně ovlivnit ani centrální, ani periferní reaktivační účinek nejvýznamnějšího reaktivátoru AChE – oximu HI-6.

Poděkování

Autoři děkují J. Petrové a M. Zechovské za technickou spolupráci a Mgr. V. Bláhovi za pomoc při statistickém zpracování výsledků.

Literatura

1. AZIZI, AA. – AZEN, SP.: Statistical analysis and computer oriented approach. 2nd ed. New York, Academic Press, 1979. 442 p.
2. BAJGAR, J.: Present view on toxodynamics of soman poisoning. Acta Med. (Hradec Králové), 1996, vol. 39, p. 101–105.
3. BAHL, JJ. – BRESTER, R.: The pharmacology of carnitine. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1987, vol. 27, p. 257–277.
4. CASSEL, GE. – FOSBRAEY, P.: Measurement of the oxime HI-6 after peripheral administration in tandem with neurotransmitter levels in striatal dialysates: effect of soman intoxication. J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 1996, vol. 35, p. 159–166.
5. CASTORINA, M. – FERRARIS, L.: Acetyl-L-carnitine affects aged brain receptorial system in rodents. Life Sci., 1994, vol. 54, p. 1205–1214.
6. CHANG, EC., et al.: Neurophysiological concomitants of soman-induced respiratory depression in awake, behaving guinea pigs. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1990, vol. 102, p. 233–238.
7. CLEMENT, JG.: HI-6: reactivation of central and peripheral acetylcholinesterase following inhibition of soman, sarin and tabun in vivo in the rat. Biochem. Pharmacol., 1982, vol. 31, p. 1283–1287.

8. CLEMENT, JG.: Central activity of acetylcholinesterase oxime reactivators. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1992, vol. 112, p. 104–109.
9. DAWSON, RM.: Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *J. Appl. Toxicol.*, 1994, vol. 14, p. 317–331.
10. ELLMAN, GL., et al.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, vol. 7, p. 88–95.
11. FLEISHER, JH. – HARRIS, LW.: Dealkylation as a mechanism for aging of cholinesterase after poisoning with pinacolyl methylphosphonofluoridate. *Biochem. Pharmacol.*, 1965, vol. 14, p. 641–649.
12. HERINK, J.: Enhancing effect of L-carnitine on some abnormal signs induced by pentylenetetrazole. *Acta Med. (Hradec Králové)*, 1996, vol. 39, p. 63–66.
13. HERINK, J., et al.: The effect of L-carnitine on pentylene-tetrazole induced seizures. *Homeostasis*, 1996, vol. 37, no. 3, p. 133–134.
14. HERINK, J., et al.: Inhibition of acetylcholinesterase activity following administration of 7-methoxytacrine and L-carnitine. *Homeostasis*, 1997, vol. 38, no. 1, p. 27–28.
15. KADAR, T., et al.: Distribution of ³H-soman in mice. *Arch. Toxicol.*, 1985, vol. 58, p. 45–49.
16. KASSA, J.: Comparison of efficacy of two oximes (HI-6 and obidoxime) in soman poisoning in rats. *Toxicology*, 1995, vol. 101, p. 167–174.
17. KASSA, J. – BAJGAR, J.: Changes of acetylcholinesterase activity in various parts of brain following nontreated and treated soman poisoning in rats. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 1998, vol. 33, no. 3, p. 175–184.
18. KASSA, J. – CABAL, J.: A comparison of the efficacy of a new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with currently available oximes and H oximes against soman by in vitro nad in vivo methods. *Toxicology*, 1999, vol. 132, p. 111–118.
19. 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.
20. LINGTENSTEIN, DA. – KOSSEN, SP.: Kinetic profile in blood and brain of the cholinesterase reactivating oxime HI-6 after intravenous administration to the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1983, vol. 71, p. 177–183.
21. LUNDY, PM. – SHIH, T-M.: Examination of the role of central cholinergic mechanisms in the therapeutic effects of HI-6 in organophosphate poisoning. *J. Neurochem.*, 1983, vol. 40, p. 1321–1328.
22. MARRS, TC.: Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.*, 1993, vol. 58, p. 51–66.
23. OHTOMI, S. – TAKASE, M. – KUMAGAI, F.: Sarin poisoning in Japan. A clinical experience in Japan Self Defense Force (JSDF) Central Hospital. *Int. Rev. Arm. Med. Ser.*, 1996, vol. 69, p. 97–102.
24. TAYLOR, P.: Anticholinesterase agents. In HARDMAN, JG. – LIMBIRD, LE. (eds), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed New York, McGraw Hill, 1996, p. 161–176.
25. Van HELDEN, HPM., et al.: Pharmacological effects of oximes: how relevant are they? *Arch. Toxicol.*, 1996, vol. 70, p. 779–786.

Korespondence: Plk. doc. MUDr. Jiří Kassa, CSc.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
E-mail: kassa@pmfhk.cz

Do redakce došlo 18. 12. 2000