

616.8-099-092.9:623.459.46:615.525

VLIV DIAZEPAMU NA SCHOPNOST ANTIDOTNÍ TERAPIE ELIMINOVAT AKUTNÍ LETÁLNÍ ÚČINKY TABUNU U MYŠÍ

Jiří KASSA

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

Souhrn

V pokusech na myších samcích byl sledován vliv antikonvulzivního léčiva diazepamu na schopnost základní antidotní terapie používané k terapii intoxikací nervově paralytickými látkami, skládající se z anticholinergika a reaktivátoru acetylcholinesterázy, snížit akutní letální účinky vybrané nervově paralytické látky – tabunu.

Vliv diazepam byl hodnocen cestou srovnání hodnot střední smrtné dávky tabunu (LD_{50}) při 24hodinovém přežití pokusných zvířat léčených základní antidotní terapií s hodnotami LD_{50} tabunu po přidání diazepam k této antidotní terapii. Ze získaných výsledků vyplývá, že diazepam signifikantně zvyšuje schopnost antidotní terapie eliminovat akutní letální účinky tabunu, pokud terapie obsahuje jako anticholinergikum atropin. Naopak diazepam prakticky neovlivní akutní toxicitu tabunu v případě použití anticholinergika s převahou centrálního účinku, s výjimkou skopolaminu. Pozorovaný pozitivní vliv diazepam na schopnost antidot eliminovat letální účinky tabunu platí pro všechny použité reaktivátory acetylcholinesterázy (HI-6, obidoxim, pralidoxim).

Antidotní terapie akutních otrav tabunem, pokud obsahuje jako anticholinergikum atropin, by měla být doplněna o diazepam nejen z důvodu zabránění centrálně vyvolaným záchvatům a tonicko-klonickým křečím, ale i z důvodu zvýšení schopnosti antidotní terapie eliminovat akutní letální účinky tabunu.

Klíčová slova: Tabun; Myš; Diazepam; HI-6; Obidoxim; Pralidoxim; Atropin; Benaktyzin; Biperiden; Skopolamin.

The Influence of Diazepam on the Antidotal Treatment-Induced Elimination of the Acute Lethal Effects of Tabun in Mice

Summary

The influence of the anticonvulsive drug diazepam on the ability of basic antidotal treatment of poisoning with nerve agents, consisting of anticholinergic drugs and acetylcholinesterase reactivators, to decrease the lethal effects of the chosen nerve agent (tabun) was demonstrated in experiments on mice.

The influence of diazepam was evaluated by the comparison of the medium lethal dose values (LD_{50}) of tabun in the case of 24h surviving tabun-exposed mice, treated with the basic antidotes involving various types of anticholinergic drugs and acetylcholinesterase reactivators, with the LD_{50} values of tabun in mice treated with antidotes completed with diazepam. Our findings confirm that diazepam is able to significantly enhance the efficacy of basic antidotal treatment to eliminate the acute lethal effects of tabun if atropine is used as the anticholinergic drug. On the other hand, no ability of diazepam to influence tabun-induced lethal effects was demonstrated if an anticholinergic drug with central effects was used (with the exception of scopolamine). The ability of diazepam to enhance the efficacy of antidotes to eliminate tabun-induced acute lethal effects was observed in the case of using all tested acetylcholinesterase reactivators (HI-6, obidoxime, pralidoxime).

The antidotal mixture against tabun, involving atropine as the anticholinergic drug, should be complemented by diazepam not only because of the prevention from centrally mediated seizures and subsequent tonic-clonic convulsions, but also because of the increase in the efficacy of antidotal treatment to eliminate tabun-induced acute lethal effects.

Key words: Tabun; Mouse; Diazepam; HI-6; Obidoxime; Pralidoxime; Atropine; Benactyzine; Biperidene; Scopolamine.

Úvod

Nervově paralytické látky (NPL) představují pro člověka stále relativně vysoké nebezpečí především z důvodu rizika zneužití těchto vysoce toxických látek pro válečné či teroristické cíle. Jejich toxický účinek spočívá především v ireverzibilní inhibici enzymu acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) a následné akumulaci neuromediátoru acetylcholinu na periferních i centrálních receptorech cholinergního nervového systému (17, 27). Mezi nejstarší NPL patří tabun (ethyl N,N-dimethylfosforamidokyanát), který je sice o něco méně toxický než soman či sarin (2, 25), ale podobně jako soman vykazuje výrazný centrální účinek, který se projevuje záchvatovitou aktivitou CNS vedoucí postupně ke generalizovaným křečím charakteru „status epilepticus“ a morfologickému poškození určitých mozkových struktur (22). Navíc jsou akutní intoxikace touto noxou při použití klasické antidotní terapie, podobně jako v případě somanu, obtížně léčitelné (3, 5, 10, 15).

Antidotní terapie akutních intoxikací organofosforovými sloučeninami spočívá především v co nejrychlejší podání reaktivátoru AChE, obnovujícího aktivitu organofosfátem inhibovaného enzymu, a anticholinergní látky, antagonizující účinek nahromaděného acetylcholinu na cholinergních receptorech. Z reaktivátorů AChE se nejčastěji používají pralidoxim, obidoxim a oxim HI-6 (5). Z anticholinergik je pro terapii akutních intoxikací NPL lékem volby atropin, u kterého však v terapeutických dávkách významně převažuje periferní antimuskarinový účinek nad centrálním účinkem, což snižuje účinnost antidotní terapie při zabránění rozvoje centrálně vyvolané záchvatové aktivity (22). Z tohoto důvodu je vhodné doplnit antidotní terapii otrav NPL anticholinergiky s převahou centrálního účinku, jako je benaktyzin, biperiden či skopolamin, za účelem zvýšení účinnosti antidotní terapie při eliminaci NPL vyvolaných záchvatů CNS s následným morfologickým poškozením některých struktur CNS (13, 16, 23).

Snížit záchvatovitou aktivitu CNS spojenou s generalizovanými epileptoformními křečemi může rovněž doplnění základní antidotní terapie akutních intoxikací NPL o antikonvulziva. Nejznámějším a nejčastěji používaným antikonvulzivem k potlačení záchvatů vyvolaných NPL je diazepam, který cestou aktivace GABAergního nervového systému může potlačit nejen záchvatovitou aktivitu CNS a konvulzivní projevy intoxikace, ale i neurobehaviorální následky intoxikace NPL (6, 24).

Cílem této práce je posoudit, zda přidání antikonvulziva diazepam k základní antidotní terapii otravy tabunem (reaktivátor AChE v kombinaci s anticholinergikem) může ovlivnit i schopnost této komplexní antidotní terapie snížit toxicitu tabunu, a

tak zvýšit odolnost zasažených jedinců vůči letálním dávkám této noxy.

Materiál a metody

Jako pokusná zvířata byli použiti samci bílých myši kmene NMRI chovu Konárovice o hmotnosti 20–25 g. Myši byly krmeny standardní Larsenovou dietou a vodou ad libitum. Pokusy prováděné na těchto zvířatech byly schváleny etickou komisí Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně v Hradci Králové.

Celý experiment byl rozdělen na dvě části. V první části experimentu byl skupinám po 12 zvířatech tabun podáván intramuskulárně v postupně se zvyšujících dávkách a za 1 minutu po intoxikaci byly myši léčeny atropinem v dávce 21 mg/kg v kombinaci s některým ze zvolených reaktivátorů AChE (HI-6, obidoxim, pralidoxim) v ekvielektivní dávce odpovídající 5 % námi zjištěné hodnoty střední smrtné dávky (LD_{50}) těchto léčiv. Polovině zvířat ($N = 6$) byl k této léčbě přidán diazepam v dávce 2,5 mg/kg, druhá polovina zvířat ($N = 6$) byla léčena pouze atropinem s reaktivátorem AChE. Ve druhé části experimentu byl skupinám po 12 zvířatech opět podáván i. m. tabun v postupně se zvyšujících dávkách a za 1 minutu po intoxikaci byly myši léčeny obidoximem v dávce 9,4 mg/kg (5 % LD_{50}) v kombinaci s některým ze zvolených anticholinergik (atropin, benaktyzin, biperiden, skopolamin) v ekvielektivní dávce odpovídající 5 % námi zjištěné hodnoty LD_{50} . Polovině těchto zvířat ($N = 6$) byl k této léčbě opět přidán diazepam v dávce 2,5 mg/kg, druhá polovina tabunem intoxikovaných zvířat ($N = 6$) byla léčena pouze kombinací obidoximu a některého ze zvolených anticholinergik.

Úmrtnost léčených experimentálních zvířat byla sledována za 24 hodin po intoxikaci a srovnávána s úmrtností neléčených experimentálních zvířat. Hodnoty LD_{50} s 95% intervalem spolehlivosti (IS) při 24hodinovém přežívání pokusných zvířat byly počítány probitovou metodou (26). Účinnost jednotlivých antidotních směsí byla vyjadřována poměrem mezi hodnotami LD_{50} léčené a neléčené intoxikace – indexem účinnosti (IU). Statistická významnost byla vyjadřována na 95% hladině významnosti ($p < 0,05$).

Výsledky

Údaje týkající se ovlivnění hodnoty LD_{50} i. m. podaného tabunu antidotní terapií obsahující atropin v kombinaci s jedním ze zvolených reaktivátorů

AChE (oxim HI-6, obidoxim, pralidoxim) a vlivu přidaného diazepamu k těmto testovaným kombinacím antidot na jejich účinnost jsou uvedeny v tabulce 1. Získané výsledky prokazují, že obidoxim výrazněji snižuje letální efekt tabunu ve srovnání s

ostatními testovanými oximy a že pozitivní vliv diazepam na schopnost antidotní terapie eliminovat akutní letální účinky tabunu se uplatní u všech testovaných kombinací antidot bez ohledu na výběr reaktivátoru AChE ($p < 0,05$).

Tabulka 1

Ovlivnění hodnoty LD₅₀ tabunu reaktivátory AChE oximem HI-6, obidoximem a pralidoximem v kombinaci s atropinem za přítomnosti nebo bez přítomnosti diazepam

Intoxikace	Terapie	LD ₅₀ (μg/kg) ± 95% IS	Index účinnosti
neléčená	---	275,4 (269,3–281,6)	---
léčená	oxim HI-6 + atropin	430,2 (414,0–444,2)*	1,56
	oxim HI-6 + atropin + diazepam	504,9 (447,1–568,9)* ^x	1,83
	obidoxim + atropin	454,9 (421,8–490,6)*	1,65
	obidoxim + atropin + diazepam	645,5 (573,8–732,4)* ^x	2,34
	pralidoxim + atropin	377,7 (355,8–400,9)*	1,37
	pralidoxim + atropin + diazepam	505,3 (448,4–569,5)* ^x	1,83

* představuje statistickou významnost vůči neléčené intoxikaci, x představuje statistickou významnost vůči léčené intoxikaci bez diazepam při $p < 0,05$

Výsledky týkající se ovlivnění hodnoty LD₅₀ i. m. podaného tabunu antidotní terapií obsahující obidoxim v kombinaci s jedním ze zvolených anticholinergik (atropin, benaktyzin, biperiden, skopolamin) a vlivu přidaného diazepam na efekt těchto antidotních směsí jsou uvedeny v tabulce 2. Z nich vyplývá, že záměnou atropinu za anticholinergika s

prevahou centrálního účinku dochází k signifikantně výraznějšímu snížení akutní toxicity tabunu ($p < 0,05$) a že vliv diazepam na zvýšení schopnosti antidotní terapie eliminovat letální účinky tabunu se signifikantně ($p < 0,05$) uplatní pouze v kombinaci obidoximu s atropinem nebo skopolaminem.

Tabulka 2

Ovlivnění hodnoty LD₅₀ tabunu obidoximem v kombinaci s atropinem, benaktyzinem, biperidenem či skopolaminem za přítomnosti nebo bez přítomnosti diazepam

Intoxikace	Terapie	LD ₅₀ (μg/kg) ± 95% IS	Index účinnosti
neléčená	---	275,4 (269,3–281,6)	---
léčená	obidoxim + atropin	454,9 (421,8–490,6)*	1,65
	obidoxim + atropin + diazepam	645,5 (568,9–732,4)* ^x	2,34
	obidoxim + benaktyzin	773,2 (636,7–939,1)*	2,81
	obidoxim + benaktyzin + diazepam	775,8 (695,7–865,2)*	2,82
	obidoxim + biperiden	716,9 (685,6–749,6)*	2,60
	obidoxim + biperiden + diazepam	715,5 (668,8–765,6)*	2,60
	obidoxim + skopolamin	716,1 (657,3–780,0)*	2,60
	obidoxim + skopolamin + diazepam	1074,0 (897,5–1285,3)* ^x	3,90

* představuje statistickou významnost vůči neléčené intoxikaci, x představuje statistickou významnost vůči léčené intoxikaci bez diazepam při $p < 0,05$

Diskuse

Pokusy *in vitro* a *in vivo* byla opakovaně prokázána velmi obtížná reaktivovatelnost tabunem inhibované AChE, což může být jednou z hlavních příčin nedostatečné účinnosti antidotní terapie při léčení akutních intoxikací tabunem (4, 10, 20, 29). Důvodem nesnadné reaktivovatelnosti tabunem inhibované AChE není rychlost dealkylace fosforylované AChE, která je na rozdíl od somanu poměrně nízká s poločasem kolem 50 hodin (9), ale zřejmě přítomnost volného elektronového páru na amidickém dusíku, který zaplňuje elektronovou vakanci ve vazbě fosfor–enzym a tím ztěžuje působení nukleofilních činidel včetně oximů (7).

Význam diazepamů pro antidotní terapii akutních intoxikací NPL spočívá především v jeho antikonvulzivním účinku a schopnosti zabránit centrálně vyvolaným záchvatům v některých oblastech CNS, především v limbické oblasti. Důsledkem tohoto terapeutického efektu diazepamů je zabránění generalizovaným tonicko-klonickým křečím a případnému morfologickému poškození některých mozkových struktur jako následku těžkých intoxikací těmito noxami (1, 16, 21). Opakovaně bylo prokázáno, že diazepam je schopen zabránit záchvatům v CNS, a tak ochránit CNS před následnou neuropatií, pokud je podán do 40 minut po intoxikaci (18, 19). Jiné práce zabývající se studiem vlivu diazepamů na průběh akutní intoxikace organofosforovými sloučeninami prokázaly, že vedle antikonvulzivního účinku se diazepam může uplatnit i svým anticholinergním účinkem v průběhu léčení akutních intoxikací těmito noxami (11, 12). Tento efekt se vysvětluje schopností diazepamů vázat se specificky na cholinergní receptor a tím snížit receptorovou vazebnost pro acetylcholin (8).

Souhrn výše uvedených pozitivních terapeutických zásahů diazepamů do průběhu akutní intoxikace NPL nastoluje otázku, zda by diazepam nemohl také zvýšit účinnost antidotní terapie při eliminaci letálních toxických účinků NPL v případě těžkých intoxikací. Výsledky této studie prokazují, že přidání diazepamů k antidotní terapii skutečně může signifikantně zvýšit míru přežití letálně intoxikovaných pokusných zvířat bez ohledu na výběr reaktivátoru AChE, pokud jako anticholinergikum byl použit atropin (2). U akutních intoxikací somanem byl pozorován podobný efekt diazepamů, avšak pouze u kombinace oximu HI-6 s atropinem (14). V případě nahrazení atropinu jiným anticholinergikem s převahou centrálního účinku se přidání diazepamů k antidotní léčbě na hodnotě LD₅₀ somanu neprojevilo, neboť tato anticholinergika mají na rozdíl od atropinu samy o sobě poměrně výrazný antikonvulzivní efekt díky svému centrálnímu anti-

muskarinovému účinku (19, 21). Podobné výsledky byly nalezeny i u antidotní terapie akutní otravy tabunem, i když v tomto případě diazepam významně zvýšil účinnost antidotní terapie při eliminaci letálních účinků tabunu i při kombinaci obidoximu se skopolaminem.

Ze srovnání vlivu testovaných antidotních směsí na hodnotu LD₅₀ tabunu také vyplývá, že při terapii akutní letální intoxikace tabunem se z reaktivátorů AChE nejvíce uplatňuje obidoxim, což potvrzují i jiné práce (4, 20, 28, 29).

Na základě získaných výsledků lze tedy konstatovat, že v případě závažné akutní otravy tabunem je nejvýhodnější pro eliminaci letálních účinků tabunu použít obidoxim jako reaktivátor AChE a pokud je kombinován s atropinem, přidat k této antidotní směsi diazepam za účelem zvýšení antikonvulzivního efektu a schopnosti eliminace letálních účinků noxy. Tato komplexní antidotní terapie významně zvyšuje naději na přežití i v případě těžkých intoxikací tabunem.

Poděkování

Autor děkuje J. Petrové a J. Uhlířové za technickou spolupráci a za pomoc při statistickém zpracování výsledků. Práce byla podpořena Linkage grantem SST.CLG.978.337. Naše poděkování patří podpoře „Scientific and Environmental Affairs Division NATO“ v Bruselu.

Literatura

1. ANDERSON, DR., et al. Antagonism of soman-induced convulsions by midazolam, diazepam and scopolamine. *Drug Chem. Toxicol.*, 1997, vol. 20, no. 3, p. 115–131.
2. BOSKOVIC, B. – KOVACEVIC, C. – JOVANOVIC, D. PAM-Cl, HI-6, and HGG-12 in soman and tabun poisoning. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1984, vol. 4, p. S106–S115.
3. CABAL, J. – BAJGAR, J. Tabun – návrat po padesáti letech. *Chem. Listy*, 1999, vol. 93, p. 27–31.
4. CLEMENT, JG. – SHILOFF, JD. – GENNINGS, C. Efficacy of a combination of acetylcholinesterase reactivators, HI-6 and obidoxime, against tabun and soman poisoning of mice. *J. Chromatogr.*, 1987, vol. 389, no. 1, p. 87–94.
5. DAWSON, RM. Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *J. Appl. Toxicol.*, 1994, vol. 14, p. 317–331.
6. DUNN, MA. – SIDELL, FR. Progress in medical defense against nerve agents. *J. Am. Med. Assoc.*, 1989, vol. 262, p. 649–652.
7. ETO, M. Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry. CRC Press Inc., Cleveland USA, 1976, p. 67–142.
8. GREEN, MD. Biochemical observations in rats following exposure to soman. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 1984, vol. 27, p. 311–314.
9. JOKANOVIC, M. Anticholinesterase activity and delayed neurotoxic effects of tabun in hens. *Vojnosanit. Pregl.*

- 1993, vol. 50, no. 5, p. 451–456.
10. JOKANOVIC, M., et al. Oxime-induced reactivation of acetylcholinesterase inhibited by phosphoramidates. *Toxicol. Lett.*, 1996, vol. 85, no. 1, p. 35–39.
 11. KASSA, J. Léčebný účinek diazepamů na intoxikaci dichlorvosem. Suppl. Sbor. věd. Prací LFUK Hradec Králové, 1992, vol. 35, no. 1, p. 59–72.
 12. KASSA, J. – BAJGAR, J. Comparison of therapeutic effects of diazepam in dichlorvos and VX poisoning. *Homeostasis*, 1994, vol. 35, no. 6, p. 309–310.
 13. KASSA, J. – KOUPILOVÁ, M. The importance of anticholinergic drug selection for the neuroprotective effects of antidotes in soman-poisoned rats. *Homeostasis*, 2000, vol. 40, no. 1/2, p. 52–53.
 14. KASSA, J. Vliv diazepamů na schopnost antidotní terapie eliminovat akutní letální účinek somanu u myši. *Čas. Lék. čes.*, 2001, vol. 140, no. 16, p. 497–499.
 15. KOPLOVITZ, I., et al. Dose-response effects of atropine and HI-6 treatment of organophosphorus poisoning in guinea pigs. *Drug. Chem. Toxicol.*, 1995, vol. 18, no. 2/3, p. 119–136.
 16. LALLEMENT, G., et al. Medical management of organophosphate-induced seizures. *J. Physiol. (Paris)*, 1998, vol. 92, p. 369–373.
 17. MARRS, TC. Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.*, 1993, vol. 58, p. 51–66.
 18. McDONOUGH, JH., et al. Comparative evaluation of benzodiazepines for control of soman-induced seizures. *Arch. Toxicol.*, 1999, vol. 73, p. 473–478.
 19. McDONOUGH, JH. Jr., et al. Anticonvulsant treatment of nerve agent seizures: anticholinergics versus diazepam in soman-intoxicated guinea pigs. *Epilepsia Res.*, 2000, vol. 38, p. 1–14.
 20. PUU, G. – ARTURSSON, E. – BUCHT, G. Reactivation of nerve agent inhibited acetylcholinesterases by HI-6 and obidoxime. *Biochem. Pharmacol.*, 1986, vol. 35, no. 9, p. 1505–1510.
 21. SHIH, TM. – McDONOUGH, JH. – KOPLOVITZ, I. Evaluation of anticonvulsant drugs for soman-induced seizure activity. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 1997, vol. 15 (Suppl. 2), p. S43–S60.
 22. SHIH, TM. – McDONOUGH, JH. Jr. Organophosphorus nerve agents-induced seizures and efficacy of atropine sulfate as anticonvulsant treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1999, vol. 64, no. 1, p. 147–153.
 23. SHIH, TM. – McDONOUGH, JH. Efficacy of biperiden and atropine as anticonvulsant treatment for organophosphorus agent intoxication. *Arch. Toxicol.*, 2000, vol. 74, p. 165–172.
 24. SIDELL, FR. Clinical considerations in nerve agent intoxication. In SOMANI, SM. (ed.). *Chemical Warfare Agents*. New York, Academic Press, 1992, 194 p.
 25. SIVAM, SP. – HOSKINS, B. – HO, IK. An assessment of comparative acute toxicity of diisopropyl fluorophosphate, tabun, sarin, and soman in relation to cholinergic and GABAergic enzyme activities in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1984, vol. 4, no. 4, p. 531–538.
 26. TALLARIDA, R. – MURRAY, R. *Manual of Pharmacological Calculation with Computer Programs*, New York, Springer-Verlag, 1987, 145 p.
 27. 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.
 28. WOREK, F., et al. Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1997, vol. 16, no. 8, p. 466–472.
 29. WOREK, F., et al. Reactivation potency of obidoxime, pralidoxime, HI-6 and HLö-7 in human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by highly toxic organophosphorus compounds. *Arch. Toxicol.*, 1998, vol. 72, no. 4, p. 237–243.
- Korespondence: Pplk. doc. MUDr. Jiří Kassa, CSc.
Katedra toxikologie
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: kassa@pmfhk.cz
- Do redakce došlo 12. 2. 2002