

615.9:615.784.5:578.084

INHIBICE ACETYLCHOLINESTERÁZY V MOZKU POTKANA VYSOKÝMI DÁVKAMI PYRIDOSTIGMINU

Jaroslav RADÍK

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

Souhrn

V práci je popsána inhibice acetylcholinesterázy vysokými dávkami pyridostigminu (100 a 200 mg/kg pyridostigminu bromidu) ve vybraných částech mozku laboratorního potkana (frontální kůra, hipokampus, hypotalamus, thalamus). Dále je práce zaměřena na porovnání vlivu různých metod zpracování mozkové tkáně včetně perfuze na aktivitu acetylcholinesterázy. Při použití uvedených dávek pyridostigminu byla prokázána inhibice mozkové AChE ve všech vybraných oddílech mozkové tkáně. Různé metody zpracování tkání významně neovlivnily aktivitu acetylcholinesterázy.

Klíčová slova: Acetylcholinesteráza; Pyridostigmin bromid; Hematoencefalická bariéra; Perfuze; Laboratorní potkan; Custodiol.

Acetylcholinesterase Inhibition in a Rat Brain with High Doses of Pyridostigmine

Summary

This study describes the inhibition of acetylcholinesterase with high doses of pyridostigmine (100 and 200 mg/kg of pyridostigmine bromide) in selected parts of a laboratory rat brain (frontal cortex, hippocampus, hypothalamus, thalamus). This study is also focused on a comparison of the influence of various methods of processing brain tissue including perfusion on acetylcholinesterase activity. When using the above-mentioned pyridostigmine doses the inhibition of brain AChE has been proven in all selected parts of the brain tissue. Various methods of tissue processing did not influence acetylcholinesterase activity significantly.

Key words: Acetylcholinesterase; Pyridostigmine bromide; Haematoencephalic barrier; Perfusion; Laboratory rat; Custodiol.

Úvod

Pyridostigmin je krátkodobě působící karbamátový inhibitor acetylcholinesterázy (AChE, E.C.3.1.1.7), strukturou připomínající acetylcholin, s nímž vykazuje kompetitivní antagonismus o molekulu AChE (6). V molekule obsahuje kvartérní dusík, a proto špatně proniká přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Působí především v periférii na nervosvalové ploténce, kde vyvolává nikotinové účinky vznikající z nadbytku nahromaděného acetylcholinu (6). Proto je používán v komplexní léčbě myastenia gravis (6). V armádách NATO je zaveden jako profylaktické antidotum proti otrávám způsobenými nervově paralytickými látkami (NPL) a v civilní praxi je ho možné použít při otravě insekticidními organofosfáty. Plazmatický poločas pyridostigminu je 3,7 hodiny. LD₅₀ pro laboratorního potkana je v literatuře uváděna v rozmezí od 2,79 do 22 mg/kg při intramuskulárním podání. Rozdílná individuální citlivost by mohla vysvětlit velké rozdíly v hodnotách LD₅₀ uváděné v literatuře (7).

U nízkých dávek pyridostigminu nebyl přestup přes HEB prokázán (3, 4, 5). Z literatury není zřej-

mé zda může prostupovat přes HEB při vyšších dávkách. Cílem této práce bylo proto zjistit, zda vysoké dávky (100 a 200 mg/kg) pyridostigminu inhibují mozkovou AChE laboratorního potkana. Možný přestup přes HEB by se projevil jako inhibice AChE v mozkové tkáni.

Vzhledem k tomu, že různé techniky zpracování vzorků mozkové tkáně by mohly ovlivnit aktivitu AChE, neboť mozek je bohatě vaskularizovaná tkáň a aktivita krevních cholinesteráz by mohla ovlivnit celkový výsledek, byl studován i vliv perfuze mozku různými roztoky na aktivitu tohoto enzymu. Druhým důvodem pro perfuzi mozku bylo vyloučení dodatečné inhibice AChE volným pyridostigminem v plazmě po homogenizaci tkáně.

Materiál a metody

Jako pokusná zvířata byli použiti samci bílého potkana kmene Wistar o hmotnosti 200–290 gramů z chovu Konárovice, Česká republika. Zvířata byla krmena standardní Larsenovou dietou a vodou ad libitum. Byla umístěna v prostředí o teplotě 22 ± 2 °C.

Experiment byl součástí studie schválené Etickou komisí LF UK v Hradci Králové.

Jako anestezie byl použit u všech zvířat Uretan (Sigma), aplikovaný intraperitoneálně (i. p.) v dávce 1,5 g/kg. Po stabilizaci anestezie (30 min) byl podán pyridostigmin bromid (PYR) (Sigma) intramuskulárně (i. m.) v dávkách 100 mg/kg a 200 mg/kg. Při použití 200mg dávky byl aplikován těsně před podáním pyridostigminu atropin v dávce 50 mg/kg i. m. za účelem přežití pokusných zvířat do doby odběru mozkové tkáně. Jako kontrola byl podáván fyziologický roztok v dávce 0,1 ml na 100 gramů i. m. Po 15 minutách byla skupině zvířat s pyridostigminem v dávce 200 mg/kg odebrána mozková tkáň bez perfuze. U skupin s dávkou pyridostigminu 100 mg/kg byla provedena perfuze mozku zavedením speciálního katétru do levé komory a prošípnutím ouška pravé síně. Infuzní set byl umístěn ve výšce 90 cm nad pracovní rovinou. Po perfuzi 75 ml roztoku (fyziologického, Custodiolu) byl mozek vyjmut a zmražen na -18°C .

Uspořádání pokusu

Pokusná zvířata byla rozdělena do 3 skupin:

V první skupině čítající 12 laboratorních potkanů byl 6 podán fyziologický roztok i. m. jako kontrola, 6 potkanům atropin i. m. (50 mg/kg) a pyridostigmin i. m. 200 mg/kg. Poté byla mozková tkáň odebrána a okamžitě zmrazena.

U druhé skupiny v počtu 6 potkanů byla 3 provedena perfuze mozku fyziologickým roztokem po i. m. podání fyziologického roztoku, dalším 3 byl aplikován pyridostigmin v dávce 100 mg/kg i. m. s následnou perfuzí mozku.

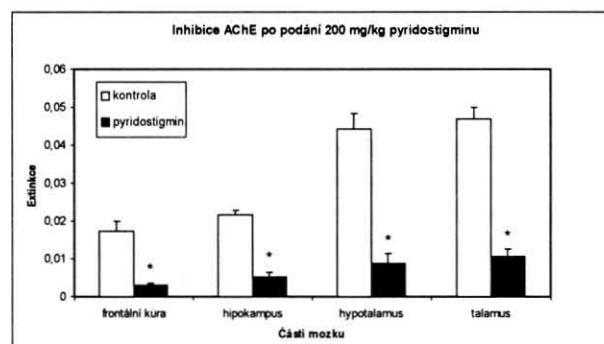
Třetí skupině v počtu 10 potkanů byl 5 podán fyziologický roztok i. m. jako kontrola a dalším 5 potkanům byla provedena perfuze mozku custodiolem.

Stanovení aktivity AChE a statistické hodnocení

Po perfuzi 75 ml roztoku byl mozek vyjmut a zmražen na -18°C . Poté byly z mozku vypreparovány frontální kůra, hipokampus, hypotalamus, talamus. Tyto části byly zhomogenizovány na homogenizátoru Ultra Turrax (Janke und Kunke, SRN). Na 1 mg mozkové tkáně byl přidán 1 ml destilované vody. Aktivita AChE v homogenátu mozkové tkáně byla stanovována modifikovanou Ellmanovou metodou (1) na spektrofotometru UVIKON 942 firmy Canberra Packard. Veškerá data byla hodnocena na 5% hladině významnosti nepárovým t-testem a Anovou.

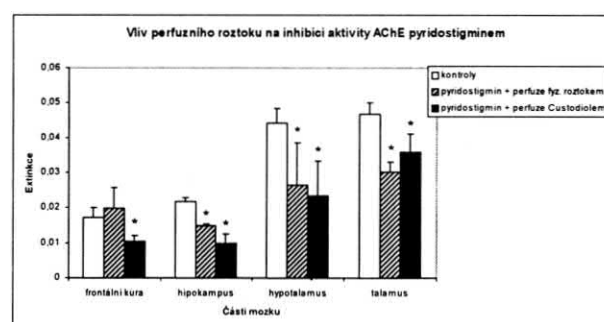
Výsledky a diskuse

Jak již bylo dříve prokázáno pyridostigmin bromid ve farmakologicky účinných dávkách ($2 \times \text{LD}_{50}$) neovlivňuje aktivitu AChE v mozku potkana (2). V této práci je prokázáno statisticky výrazné snížení aktivity mozkové AChE ve všech sledovaných částech mozku laboratorního potkana po podání pyridostigminu v dávce 200 mg/kg (graf 1).



Graf 1: Aktivita AChE ve vybraných částech mozku potkana po i. m. podání 200 mg/kg pyridostigminu bromidu bez perfuze. Aktivita AChE je vyjádřena jako změna extinkce měřené modifikovanou Ellmanovou metodou. Modré sloupce označují kontrolní hodnoty aktivity AChE, červené označují hodnoty po podání pyridostigminu.

Statisticky významný pokles aktivity AChE je demonstrován i v případě podání pyridostigminu v dávce 100 mg/kg a následné perfuzi ve všech sledovaných částech mozku, pouze ve frontální kůře při perfuzi fyziologickým roztokem byly rozdíly na hranici významnosti (graf 2).



Graf 2: Vliv perfuzního roztoku na inhibici aktivity AChE pyridostigminem po i. m. podání 100 mg/kg a perfuzi fyziologickým roztokem nebo custodiolem. Aktivita AChE je vyjádřena jako změna extinkce měřené modifikovanou Ellmanovou metodou. Modré sloupce označují kontrolní hodnoty aktivity AChE bez perfuze, červené sloupce hodnoty po aplikaci pyridostigminu a perfuzi fyziologickým roztokem, žluté sloupce označují hodnoty po podání pyridostigminu a perfuzi custodiolem.

Při použití výše uvedených dávek pyridostigminu byla prokázána statisticky významná inhibice

mozkové AChE ve všech vybraných oddílech mozkové tkáně (mimo frontální kůry), tzn. že pyridostigmin proniká přes HEB. Dále bylo statisticky prokázáno, že vliv perfuze na aktivitu AChE je nevýznamný.

Z práce vyplynulo, že pyridostigmin bromid ve vysokých dávkách proniká přes HEB a inhibuje mozkovou AChE, avšak inhibice AChE je závislá na dávce pyridostigminu. Hraniční dávka nebyla dosud stanovena. Ukázalo se, že je možno i nadále používat metody zpracování mozkové tkáně bez perfuze, které jsou časově, materiálně i finančně méně náročné. Nebyl prokázán ani významný rozdíl v perfuzních roztocích.

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Jiřímu Bajgarovi, DrSc. za vedení práce a paní Marii Zechovské a Růženě Věříšové za technickou pomoc.

Literatura a prameny

1. BAJGAR, J. Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Voj. zdrav. Listy*, 1972, vol. 70, s. 78–80.
2. BAJGAR, J. – PORTMAN, R. The treatment of intoxication with selected organophosphates and carbamate: Comparison of different therapeutic approaches. World congress on chemical and biological terrorism, 22–27 April, 2001, Dubrovnik, Croatia, *Abstr. no. 28*.
3. GRAUER, E. – ALKALAI, D. – KAPON, J. Stress does not enable pyridostigmine to inhibit brain cholinesterase after parenteral administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2000, vol. 164, p. 301–304.
4. LALLEMENT, G. – FOQUIN, A. – BAUBICHON, D. Heat stress, even extreme, does not induce penetration of pyridostigmine into brain of guinea pigs. *Neurotoxicology*, 1998, vol. 19, p. 759–66.
5. KURT, T. Epidemiological association in US veterans between Gulf War illness and exposures to anticholinesterases. *Toxicol. Lett.*, 1998, vol. 102/103, p. 523–526.
6. Kolektiv autorů. *Remedia compendium*. 1999.
7. TOXSYS. Toxicants Pyridostigmine. Databáze dostupná na CD-ROM.

Korespondence: Npor. MUDr. Jaroslav Radík
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: jaroslav.radik@email.cz

Do redakce došlo 3. 8. 2001