

VLIV DÉLKY A TVARU SPOJOVACÍHO ŘETĚZCE BISKVARTERNÍCH REAKTIVÁTORŮ ACETYLCHOLINESTERÁZY NA JEJICH SCHOPNOST REAKTIVOVAT ENZYM INHIBOVANÝ SARINEM

¹Ing. Kamil KUČA, PhD., ¹kpt. Mgr. Daniel JUN, PhD., ²Mgr. Kamil MUSÍLEK

¹Univerzita obrany, katedra toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

²Univerzita Karlova v Praze, katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové

Souhrn

Antidotní přípravky určené pro léčbu intoxikací nervově paralytickými látkami se skládají z anticholinergik (atropin) a reaktivátorů acetylcholinesterázy (AChE) (pralidoxim, obidoxim, methoxim nebo látka HI-6). Vzhledem k tomu, že v současnosti neexistuje univerzální reaktivátor schopný reaktivovat AChE inhibovanou všemi potenciálními nervově paralytickými látkami, vývoj nových účinnějších reaktivátorů stále pokračuje. Za tímto účelem je nutné znát, jak jednotlivé strukturální faktory reaktivátorů ovlivňují jejich reaktivační schopnost. Mezi nejvíce diskutované faktory patří přítomnost a počet oximových skupin, přítomnost a počet kvarterních dusíků, délka a tvar spojovacího řetězce. V této práci bylo *in vitro* testováno jedenáct reaktivátorů AChE lišících se délkou a tvarem spojovacího řetězce. Jako vhodný zástupce nervově paralytických látek byl použit sarin. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší reaktivační schopnosti bylo dosaženo u trimedoximu (54 %) a oximu K074 (54 %). Tato reaktivační schopnosti však bylo dosaženo v koncentracích nedosažitelných u člověka v průběhu antidotní terapie (10^{-3} M). V terapeuticky relevantních koncentracích (10^{-5} M) se jeví jako nadějně oximy TO 047 (20 %) a TO 033 (28 %).

Klíčová slova: Sarin; Acetylcholinesteráza; Nervově paralytické látky; Reaktivátor; Oxim.

Influence of Length and Shape of the Connecting Chain of Bisquaternary Acetylcholinesterase Reactivators on Their Potency to Reactivate Enzyme Inhibited by Sarin

Summary

Antidotal treatment of nerve agent poisonings consists of anticholinergics (atropine mainly) and acetylcholinesterase (AChE) reactivators (pralidoxime, obidoxime, methoxime or HI-6). Due to the fact that currently available AChE reactivators are not able to reactivate AChE inhibited by all potential nerve agents, the development of new AChE reactivators still continues. For this purpose, the understanding of relationship between structural factors and their influence on the reactivation potency is useful. Especially, presence and number of functional oxime groups, presence and number of quaternary nitrogens, length and shape of the connecting chain are discussed. Eleven AChE reactivators differing in the length and shape of the connecting chain were tested by *in vitro* methods in this work. Sarin was used as a representative of the nerve agent family. As resulted, the highest reactivation potency was achieved for trimedoxime (54 %) and oxime K074 (54 %). This reactivation potency was, however, obtained at concentration (10^{-3} M) that is not attainable for human use. Oximes TO 047 and TO 033 seem to be the most potent AChE reactivator tested in this study at concentration (10^{-5} M) that is relevant for human use.

Keywords: Sarin; Acetylcholinesterase; Nerve agents; Reactivator; Oxime.

Úvod

Organofosforové sloučeniny se užívají v zemědělství jako pesticidy (paraoxon, parathion) či ve vojenském prostředí jako bojové chemické látky (nervově paralytické látky; NPL). V minulosti byly zneužity při teroristickém útoku v Tokiu (1, 2). S narůstající hrozbou terorismu je hrozba intoxikací těmito látkami

poměrně vysoká. Mezi nejznámější zástupce NPL patří sarin (GB; O-isopropylmethylfluorofosfonát), soman (GD; O-pinakolylmethylfluorofosfonát), tabun (GA; O-ethyl-dimethylamidokyanofosfát) a látka VX (O-ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl)-methylthiofosfonát) (3).

NPL inhibují enzym acetylcholinesterázu (AChE; EC 3.1.1.7) cestou fosforylace. Následkem inhibice

nemůže enzym plnit svou fyziologickou úlohu (štěpení neuromediátoru acetylcholinu na nervových synapsích), nahromaděný acetylcholin nadměrně stimuluje nervové receptory, což se klinicky projeví cholinergní krizí. Intoxikovaný organismus může bez léčby v případech těžké intoxikace zemřít následkem respiračního a srdečního selhání (4).

Pro obnovení funkce enzymu se užívají reaktivátory AChE. Mezi nejznámější zástupce patří pralidoxim (2-PAM; 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium chlorid), obidoxim (Toxogonin®; 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxa-propan dichlorid) či oxim HI-6 (1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxa-propan dichlorid). Jejich reaktivací efekt spočívá ve štěpení vazby vzniklé při inhibici mezi enzymem a NPL (5).

Žádný z dosud syntetizovaných reaktivátorů AChE nedokáže reaktivovat enzym inhibovaný všemi druhy NPL. Proto se mnoho institucí zabývajících se touto problematikou snaží predikovat a následně syntetizovat struktury ideálního širokospektrého reaktivátoru AChE, který by dokázal reaktivovat enzym inhibovaný všemi typy NPL (6-8).

V současnosti užívané reaktivátory AChE patří z chemického hlediska mezi mono (pralidoxim) či biskvarterní (obidoxim, HI-6, methoxim) pyridiniové sloučeniny s funkční aldoximovou skupinou. Tyto látky musí obsahovat ve své struktuře některé důležité rysy, bez nichž by jejich reaktivací schopnost byla nízká či nulová. Mezi nej důležitější patří přítomnost a počet oximových skupin, přítomnost a počet kvarterních dusíků, délka a tvar spojovacího řetězce mezi jednotlivými pyridiniovými jádry (9).

V této práci jsme se zaměřili na jeden z výše uvedených faktorů, a to na délku a tvar spojovacího řetězce mezi jednotlivými pyridiniovými jádry. Za tímto účelem bylo *in vitro* testováno jedenáct reaktivátorů AChE (Tabulka 1) lišících se pouze v délce a tvaru spojovacího řetězce. Jako vhodný zástupce NPL byl použit sarin.

Materiál a metody

Testované reaktivátory AChE (tabulka 1) byly již dříve syntetizovány na katedře toxikologie FVZ UO. Všechny další užité chemikálie analytické čistoty byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (ČR). NPL sarin (čistota 96 %) byla získána z Vojenského technického ústavu ochrany (Brno). Jako zdroj

AChE byl užit 10% homogenát z mozků laboratorního potkana. Reaktivací účinnost byla testována *in vitro* na AChE inhibované sarinem užitím standardního screeningového reaktivacího testu (10). Homogenát z mozků laboratorního potkana (0,5 ml) byl smíchán s 20 μ l iso-propylalkoholového roztoku sarinu a inkubován za teploty 25 °C po dobu 30 min. Poté bylo ke směsi přidáno 2,5 ml roztoku chloridu sodného (3 M) a doplněno destilovanou vodou na celkový objem 23 ml. Nakonec byly přidány 2 ml roztoku acetylcholin jodidu (0,02 M). Enzymová aktivita byla měřena při konstantním pH 8,0 a teplotě 25 °C pomocí autotitrátoru RTS 822 (Radiometer; Dánsko). Aktivita intaktního (a_0) a sarinem inhibovaného (a_i) enzymu byly odečteny ze závislosti spotřeby roztoku hydroxidu sodného (0,01 M) na čase, která je přímo úměrná titrované kyselině octové uvolněné hydrolýzou acetylcholinu. K roztoku AChE inhibované sarinem byl přidán roztok reaktivátoru dané koncentrace (10^{-5} M a 10^{-3} M) a celá směs byla inkubována po dobu 10 min. Aktivita reaktivované AChE (a_r) byla opět odečtena ze závislosti spotřeby roztoku hydroxidu sodného na čase.

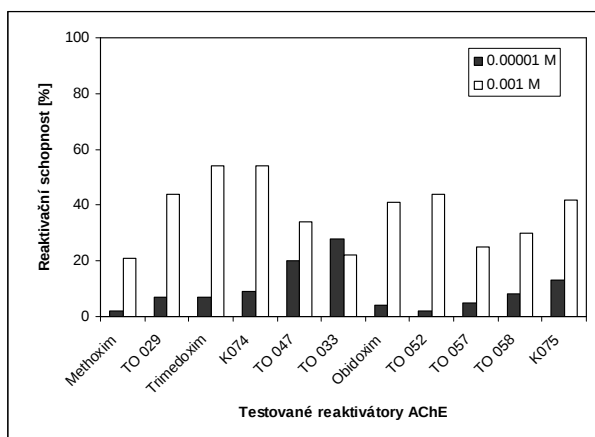
Z naměřených hodnot aktivit bylo vypočítáno množství reaktivované AChE (%) podle vzorce:

$$x = \left(1 - \frac{a_r - a_i}{a_0 - a_i} \right) \cdot 100 \quad [\%]$$

Výsledky

Vypočítané hodnoty (%) reaktivace AChE inhibované sarinem pro dvě rozdílné koncentrace reaktivátoru (10^{-3} M a 10^{-5} M) jsou uvedeny v tabulce 1; hodnoty jsou výsledkem průměru dvou nebo tří nezávislých měření. Vztah mezi koncentrací a reaktivací účinností všech studovaných reaktivátorů vyjadřuje graf 1.

Z naměřených dat vyplývá, že všechny reaktivátory AChE dosahují vyšší reaktivací schopnosti při koncentraci 10^{-3} M. Jediným reaktivátorem s odlišným chováním byl oxim TO 033, jenž dosáhl vyšší reaktivací schopnosti při koncentraci 10^{-5} M. Nejvyšší reaktivací účinnosti bylo dosaženo u trimedoximu (54 %) a oximu K074 (54 %). Této hodnoty reaktivace však bylo dosaženo při koncentracích nedosažitelných u člověka během antidotní terapie (10^{-3} M). V relevantních dávkách (10^{-5} M) se jeví jako nadějně oximy TO 047 (20 %) a TO 033 (28 %).



Graf 1: Reactivační účinnost studovaných reaktivátorů AChE při dvou koncentracích

Tabulka 1

Reaktivační účinnost použitých reaktivátorů vůči AChE inhibované sarinem

Reaktivátor	Spojovací řetězec	Reaktivace [%] [#]	Reaktivace [%] [*]
Methoxim	CH ₂	2	21
TO 029	CH ₂ CH ₂	7	44
Trimedoxim	CH ₂ CH ₂ CH ₂	7	54
K074	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	9	54
TO 047	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	20	34
TO 033	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	28	22
Obidoxim	CH ₂ OCH ₂	4	41
TO 052	CH ₂ C(=O)CH ₂	2	44
TO 057	CH ₂ CH ₂ SO ₂ CH ₂ CH ₂	5	25
TO 058	CH ₂ CH ₂ S ⁺ (CH ₃)CH ₂ CH ₂	8	30
K075	CH ₂ CH=CHCH ₂	13	42

[#]koncentrace testovaných reaktivátorů 10⁻⁵ M

^{*}koncentrace testovaných reaktivátorů 10⁻³ M

Diskuse

Chemická struktura reaktivátorů AChE zásadně ovlivňuje proces reaktivity AChE inhibované jak NPL, tak organofosforovými pesticidy (9, 11). Žádný z reaktivátorů AChE zavedený v AČR není schopen reaktivovat AChE inhibovanou všemi typy inhibitorů. Bohužel ani oxim HI-6, v současnosti preferovaný konsorciem šesti států – Kanada, Nizozemí, Německo, Švédsko, Dánsko a Anglie

(12), není schopen reaktivovat AChE inhibovanou tabunem či některými pesticidy (13, 14). Proto nemůže být ani tento oxim označen jako širokospektrý.

Díky nedostatečné schopnosti současně užívaných reaktivátorů AChE reaktivovat inhibovanou AChE bez ohledu na typ inhibitoru stále pokračuje vývoj nových účinnějších reaktivátorů, kterými by mohly být nahrazeny reaktivátory stávající (15–19). Aby nebyly zbytečně syntetizovány látky s nízkou reaktivační schopností, vychází se při jejich přípravě z obecně známých struktur nebo se využívá znalosti esenciálních fragmentů obsažených ve strukturách známých reaktivátorů (20).

Mezi nejdůležitější strukturální části obsažené v molekule reaktivátorů patří přítomnost a počet oximových skupin, přítomnost a počet kvarterních dusíků a délka a tvar spojovacího řetězce mezi jednotlivými pyridiniovými jádry (9).

V této práci jsme se pokusili zjistit míru ovlivnění reaktivačního procesu změnou struktury spojovacího řetězce u látek se dvěma pyridiniovými jádry (biskvarterní reaktivátory). Aby jejich reaktivační schopnost nebyla ovlivněna ostatními strukturálními faktory, byly další strukturální znaky totožné (tzn. stejný počet oximových skupin v téže poloze na obou pyridiniových jádrech). Z výsledků vyplývá, že délka a tvar spojovacího řetězce zásadně ovlivňují reaktivační účinnost reaktivátorů AChE. To znamená, že nevhodnou volbou spojovacího řetězce může být velmi snížena reaktivační schopnost oximu a naopak, jeho vhodnou volbou může být tato schopnost zvýšena. Bylo zjištěno, že při reaktivacích pomocí vyšších koncentrací reaktivátoru je ideální délka spojovacího řetězce při reaktivaci AChE inhibované sarinem tři až čtyři členy, zatímco při nižších koncentracích jsou vhodnější řetězce delší – pět a šest členů. Dále bylo zjištěno, že změnou methylenové skupiny ve spojovacím řetězci za jinou skupinu výše uvedená závislost neplatí a reaktivační schopnost reaktivátorů s odlišným spojovacím řetězcem se řídí jinými, doposud neznámými pravidly. Pravděpodobně je změna reaktivační schopnosti oximů s odlišnými spojovacími řetězci způsobena interakcí volných elektronových párů (obidoxim, TO 052 a TO 057), dvojných vazeb (K075) či kationtu (TO 058) s vnitřkem kavity enzymu. Tato hypotéza bude v budoucnosti dále ověřována pomocí metod molekulárního designu, kterým je možno simulovat proces reaktivity na molekulární úrovni (Wiesner et al., 2005; Kuca et al., 2005).

Poděkování:

Autoři děkují laborantům Martině Hrabínové, Janě Uhlířové a Petru Stodůlkovi za kvalitní technickou pomoc. Práce byla finančně podpořena grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy – ME865.

Literatura

1. BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.*, 2004, vol. 38, no. 1, p. 151–216.
2. BAJGAR, J. *Use of chemical weapons and negatiation on their prohibition: from history to present time* (In Czech). Hradec Kralove, Nucleus, 2006. 180 p.
3. PATOČKA J., aj. *Vojenská toxikologie*. Praha, Grada, 2004. 178 s.
4. MARRS, TC. Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.*, 1993, vol. 58, no. 1, p. 51–66.
5. KASSA, J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 2002, vol. 40, no. 3, p. 803–816.
6. PANG, YP. – KOLLMEYER, TM. – HONG, F., et al. Rational design of alkylene-linked bis-pyridiniumaldoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. *Chem. Biol.*, 2003, vol. 10, no. 6, p. 491–502.
7. HAMMOND, PI. – KERN, C. – HONG, F., et al. Cholinesterase reactivation *in vivo* with a novel bis-oxime optimized by computer-aided design. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, vol. 307, no. 1, 190–196.
8. DOHNAL, V. – KUČA, K. – JUN, D. Prediction of a new broad-spectrum reactivator capable to reactivate acetylcholinesterase inhibited by nerve agents. *J. Appl. Biomed.*, 2005, vol. 3, no. 3, p. 139–145.
9. KUČA, K. – JUN, D. – MUSÍLEK, K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2006, vol. 6, no. 3, p. 269–277.
10. KUČA, K. – CABAL, J. Evaluation of newly synthesized reactivators of the brain cholinesterase inhibited by sarin-nerve agent. *Toxicol. Mech. Meth.*, 2005, vol.15, no. 4, p. 247–252.
11. GRAY, AP. Design and structure-activity relationships of antidotes to organophosphorus anticholinesterase agents. *Drug Met. Rev.*, 1984, vol. 15, no. 3, p. 557–589.
12. STOJILJKOVIC, MP. Choise of oximes in organophosphate poisonings. CBMTS – Industry IV, Croatia, Dubrovnik, 17.–23. september 2005.
13. CABAL, J. – KUČA, K. – KASSA, J. Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Pharmacol. Toxicol.*, 2004, vol. 95, no. 2, p. 81–86.
14. WOREK, F., et al. Reactivation by various oximes of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus compounds. *Arch. Toxicol.*, 1996, vol. 70, no. 8, p. 497–503.
15. YANG, GY. – YOON, JH. – SEONG, CM., et al. Synthesis of bis-pyridinium oxime antidotes using bis(methyl-sulfonylmethyl) ether for organophosphate nerve agents. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2003, vol. 24, no. 9, p. 1368–1370.
16. KIM, TH. – KUČA, K. – JUN, D. – JUNG YS. Design and synthesis of new bis-pyridinium oximes as cyclosarin-inhibited acetylcholinesterase reactivators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, vol. 15, no. 11, p. 2914–2917.
17. CHENNAMANENI, SR. – VOBALABOINA, V. – GARLAPATI, A. Quaternary salts of 4,3' and 4,4' bis-pyridinium monooximes: Synthesis and biological activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, vol. 15, no. 12, p. 3076–3080.
18. MUSÍLEK, K. – KUČA, K. – JUN, D., et al. Synthesis of the novel series of bispyridinium compounds bearing (E)-but-2-ene linker and evaluation of their reactivation activity against chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, vol.16, no. 3, p. 622–627.
19. MUSÍLEK, K. – KUČA, K. – JUN, D., et al. Synthesis of the novel series of bispyridinium compounds bearing xylene linker and evaluation of their reactivation activity against chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2005, vol. 20, no. 5, p. 409–415.
20. KUČA, K., et al. Synthesis of potential reactivator of acetylcholinesterase – 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(carbamoylpyridinium)-propane dibromide. *Tetrahedron Lett.*, 2003, vol. 44, no. 15, p. 3123–3125.
21. KUČA, K. – CABAL, J. – JUN, D., et al. Development of new acetylcholinesterase reactivators – antidotes used for treatment of nerve agent poisonings. *Biomed. Papers*, 2005, vol. 149, no. 2, p. 429–431.
22. WIESNER, J. – KŘÍŽ, Z. – KUČA, K., et al. Počítačové modelování a simulace – nové technologie při vývoji prostředků proti chemickým bojovým látkám. *Voj. zdrav. Listy*, 2005, roč. 74, č. 5/6, s. 165–171.

Korespondence: Ing. Kamil Kuča, Ph.D.

Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: kucakam@pmfhk.cz
kucakam@seznam.cz

Do redakce došlo 26. 9. 2005