

SROVNÁNÍ SCHOPNOSTI NOVĚ SYNTETIZOVANÝCH OXIMŮ (K074, K075) A OXIMŮ ZAVEDENÝCH V AČR (OBIDOXIM, HI-6) REAKTIVOVAT TABUNEM ČI SOMANEM INHIBOVANOU ACETYLCHOLINESTERÁZU V KRVÍ A MOZKU POTKANA

¹Jiří KASSA, ²Daniel JUN

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

²Centrum pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové

Souhrn

Na samcích potkana kmene Wistar byl testován reaktivační účinek nově syntetizovaných oximů (K074, K075) a srovnáván s reaktivačním efektem oximů zavedených do zdravotnické výbavy AČR jako antidotum první pomoci (obidoxim) či lékařské pomoci (HI-6). Schopnost oximů reaktivovat tabunem nebo somanem inhibovanou acetylcholinesterázu byla hodnocena cestou srovnání aktivity acetylcholinesterázy v krvi a mozku potkana měřené 30 minut po otravě tabunem nebo somanem. Získané výsledky ukázaly, že nově syntetizované oximy jsou účinnějšími reaktivátory tabunem inhibované mozkové acetylcholinesterázy než dosud používané oximy, avšak v případě otravy somanem nedosahují reaktivačního efektu oximu HI-6.

Klíčová slova: Tabun; Soman; Acetylcholinesteráza; HI-6; Obidoxim; K074; K075; Atropin; Potkan.

A Comparison of Newly Synthesized Oximes (K074, K075) and Oximes Introduced into the Czech Army (Obidoxime, HI-6) to Reactivate Tabun or Soman-Inhibited Acetylcholinesterase in Rat's Blood and Brain

Summary

The reactivating efficacy of newly synthesized oximes (K074, K075) and the oximes introduced into the Czech Army for the first aid (obidoxime) and medical care (HI-6) was evaluated in male Wistar rats. The potency of oximes to reactivate tabun or soman-inhibited acetylcholinesterase was evaluated by the comparison of the activity of acetylcholinesterase in rat's blood and brain measured 30 minutes following tabun or soman poisoning. The obtained results demonstrate that newly synthesized oximes are more effective than currently used oximes in the reactivation of tabun-inhibited brain acetylcholinesterase but less effective than the oxime HI-6 against soman.

Key words: Tabun; Soman; Acetylcholinesterase; HI-6; Obidoxime; K074; K075; Atropine; Rat.

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, 22). Antidotní terapie akutních intoxikací organofosforovými sloučeninami, mezi něž NPL patří, spočívá především v co nejrychlejší podání reaktivátoru AChE, obnovujícího aktivitu inhibované AChE, a anticholinergní látky, antagonizující účinek nahromaděného acetylcholinu na cholinergních receptorech (6, 12).

Tabun (O-ethyl-N,N-dimethyl amidokyanofosfát a soman (pinakolyl methylfluorofosfonát) patří mezi nejnebezpečnější NPL z důvodu obtížného terapeutického zásahu do mechanismu jejich toxického účinku. Příčinou obtížené léčitelnosti akutních otrav tabunem je pravděpodobně existence volného elektronového páru na amidové skupině, která výrazně ztěžuje nukleofilní zásah oximů (2, 10). Příčinou obtížené léčitelnosti akutních otrav somanem je naproti tomu velmi rychlá dealkylace komplexu enzym–inhibitor, který se následkem odštěpení alkyly vodou stává prakticky nereaktivovatelným (1, 12). Běžně používané reaktivátory fosforylované nebo fosfonylované AChE – monopyridiniové a bispyridiniové oximy, vykazují minimální účinnost při eliminaci akutních toxických účinků obou nox z důvodu velmi nízké reaktivační účinnosti (12). Poslední

zavedený reaktivátor AChE do AČR – oxim HI-6, je sice účinnější při terapii akutních otrav somanem než ostatní běžně používané oximy (11, 20), ale jeho účinnost vůči tabunu je velmi nízká (5, 23). Z tohoto důvodu je pátrání po novém reaktivátoru AChE dostatečně účinném proti somanu i tabunu dlouhodobým cílem celé řady výzkumných pracovišť na celém světě.

V minulém roce byly na naší katedře syntetizovány 2 nové symetrické bispiridiniové oximy K074 [1,4-bis(4-hydro-xyiminomethylpyridinium) butan dibromid] a K075 [1,4-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)but-2-en dibromid] (obr. 1) za účelem zvýšení účinnosti antidotní terapie akutních otrav tabunem a somanem (15).

Cílem této studie je srovnání schopnosti nově syntetizovaných oximů (K074, K075) a oximů zavedených v AČR (obidoxim, HI-6) reaktivovat tabunem nebo somanem inhibovanou acetylcholines-terázu v krvi a mozku otrávených potkanů.

Materiál a metody

Jako pokusná zvířata byli použiti samci bílých potkanů kmene Wistar chovu Konárovice o hmotnosti 200–220 g. Potkani byli krmeni standardní Larsenovou dietou a vodou ad libitum. Kontrolní i experimentální zvířata byla rozdělena do skupin po 6 zvířatech. Pokusy prováděné na těchto zvířatech byly schváleny Etickou komisí Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové (dále FVZ). Obě NPL o čistotě 90–95 % byly získány z Vojenského technického ústavu ochrany, Brno. Jejich čistota byla hodnocena acidimetrickou titrací. Všechny oximy byly syntetizovány na katedře toxikologie FVZ. Jejich čistota byla analyzována pomocí HPLC. Ostatní chemikálie analytické čistoty byly zakoupeny komerční cestou a použity bez dalšího čištění. Všechny látky byly potkanům podávány intramuskulárně (i. m.) v objemu 0,1 ml/kg hmotnosti.

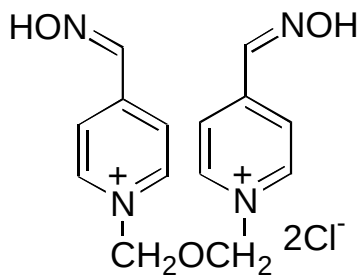
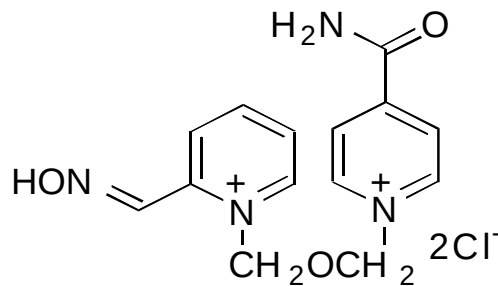
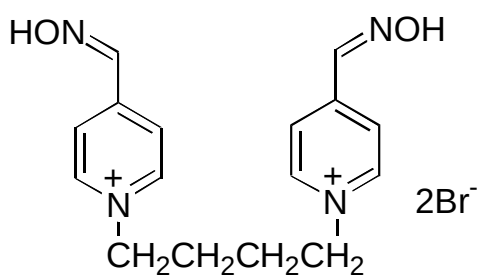
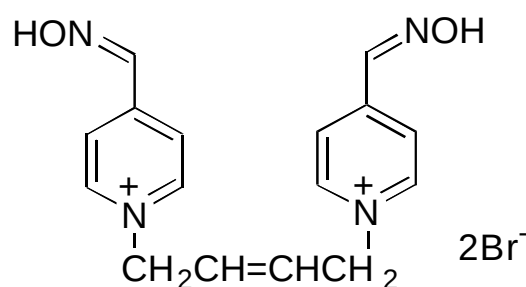
Za účelem hodnocení reaktivační účinnosti vybraných oximů *in vivo* byl pokusným zvířatům nejprve podán i. m. atropin v dávce 21 mg/kg hmotnosti samotný nebo v kombinaci s jedním z testovaných oximů, které byly aplikovány v ekvimolární dávce odpovídající 50 $\mu\text{mol/kg}$ hmotnosti, a za 5 minut po podání antidot byla zvířata intoxikována i. m. tabunem (200 $\mu\text{mol/kg}$) nebo soma-

nem (120 $\mu\text{mol/kg}$) v dávce odpovídající jejich hodnotě LD_{50} . Kontrolním potkanům byla místo antidot a NPL podán fyziologický roztok ve stejném objemu. Za 30 min po otravě byla pokusná zvířata usmrcena dekapitací a byla odebrána krev a mozek. Plná krev byla hemolyzována a mozek byl homogenizován v destilované vodě. Aktivita AChE v plné krvi a mozku byla měřena spektrofotometrickou metodou podle Ellmana (7). Procento reaktivace bylo počítáno s využitím naměřených hodnot aktivity AChE pomocí vzorce: $1 - [((\text{oxim} + \text{atropin}) - (\text{fyz. roztok})) / ((\text{atropin}) - (\text{fyz. roztok}))] \times 100$ (4). Aktivita AChE byla vyjadřována v $\mu\text{kat/kg}$ nebo l (μmol hydrolyzovaného substrátu/kg vlhké tkáně nebo l krve/s). Statistické hodnocení získaných výsledků bylo prováděno pomocí analýzy rozptylu s následným hodnocením kontrastů metodou Scheffeho na 95% hladině významnosti ($p < 0,05$) (21).

Výsledky

Údaje týkající se reaktivační účinnosti vybraných oximů vůči tabunu jsou uvedeny v tabulce 1. Získané výsledky prokázaly, že na periférii se jako nejúčinnější reaktivátor tabunem inhibované AChE jeví obidoxim, i když rozdíl ve schopnosti reaktivovat tabunem inhibovanou AChE v plné krvi mezi obidoximem a nově vyvinutými oximy (K074, K075) nebyly statisticky významné. Navíc schopnost obidoximu reaktivovat tabunem inhibovanou AChE v mozku otrávených potkanů byla na rozdíl od obou K oximů zanedbatelná. Bylo prokázáno, že nově syntetizovaný oxim K074 je statisticky účinnějším reaktivátorem tabunem inhibované AChE v mozku otrávených potkanů než všechny ostatní testované oximy ($p < 0,05$) (tab. 1).

Hodnocení reaktivační účinnosti vybraných oximů vůči somanu přineslo zcela jiné výsledky, jak je dokumentováno v tabulce 2. Oxim HI-6, prakticky neúčinný vůči tabunu, se ukázal jako nejlepší reaktivátor somanem inhibované AChE mezi testovanými oximy, neboť byl jako jediný schopen reaktivovat somanem inhibovanou AChE v periferním i centrálním kompartmentu, byť tato reaktivace nebyla statisticky významná. Naproti tomu obidoxim stejně jako oba nově syntetizované oximy K074 a K075 nebyl schopen reaktivovat somanem inhibovanou AChE bez ohledu na místo účinku (tab. 2).

**Obidoxim****HI-6****K074****K075**

Obr. 1: Chemická struktura oximů

Tabulka 1

Míra reaktivace tabunem inhibované AChE testovanými oximy v krvi a mozku potkana
(aktivita AChE měřena v $\mu\text{kat/l}$ nebo $\mu\text{kat/kg}$)

TERAPIE	Krev	Mozek
Atropin	$4,55 \pm 1,19$	$11,63 \pm 1,27$
Atropin + obidoxim (% reaktivace)	$7,14 \pm 0,66$ (24,3*)	$9,25 \pm 1,54$ (0)
Atropin + HI-6 (% reaktivace)	$3,95 \pm 0,39$ (0)	$12,40 \pm 0,71$ (6,7)
Atropin + K074 (% reaktivace)	$6,56 \pm 1,04$ (18,8*)	$21,60 \pm 3,03$ (86,8*)
Atropin + K075 (% reaktivace)	$6,64 \pm 0,75$ (19,6*)	$13,22 \pm 0,95$ (13,9)

*Signifikantně odlišné od skupiny léčené samotným atropinem na hladině významnosti $p < 0,05$. Kontrolní hodnota AChE v plné krvi potkana byla $15,20 \mu\text{kat/l}$ a v mozku potkana byla $23,11 \mu\text{kat/kg}$.

Tabulka 2

Míra reaktivace somanem inhibované AChE testovanými oximy v krvi a mozku potkana
(aktivita AChE měřena v $\mu\text{kat/l}$ nebo $\mu\text{kat/kg}$)

TERAPIE	Krev	Mozek
Atropin	$4,62 \pm 0,32$	$4,83 \pm 1,45$
Atropin + obidoxim (% reaktivace)	$4,43 \pm 0,55$ (0)	$2,95 \pm 1,71$ (0)
Atropin + HI-6 (% reaktivace)	$5,32 \pm 0,68$ (10,7)	$7,26 \pm 4,14$ (6,2)
Atropin + K074 (% reaktivace)	$4,10 \pm 0,44$ (0)	$2,66 \pm 0,94$ (0)
Atropin + K075 (% reaktivace)	$4,40 \pm 0,34$ (0)	$3,78 \pm 0,97$ (0)

Kontrolní hodnota AChE v plné krvi potkana byla $11,18 \mu\text{kat/l}$ a v mozku potkana byla $44,19 \mu\text{kat/kg}$.

Diskuse

Pokusy *in vitro* a *in vivo* byla opakovaně prokázána velmi obtížná reaktivovatelnost tabunem i somanem inhibované AChE, což může být jednou z hlavních příčin nedostatečné účinnosti antidotní terapie při léčení akutních intoxikací tabunem i somanem (5, 10, 13, 19, 23). Důvodem nesnadné reaktivovatelnosti somanem inhibované AChE je extrémně vysoká rychlost dealkylace fosfonylované AChE (1, 13). Naproti tomu příčinou obtížné reaktivovatelnosti tabunem inhibované AChE není rychlost dealkylace fosforylované AChE, jež je na rozdíl od somanu poměrně nízká s poločasem kolem 50 hodin (9), ale zřejmě přítomnost volného elektronového páru na amidickém dusíku, jenž zaplňuje elektronovou vakanci ve vazbě fosfor–enzym a tím ztěžuje působení nukleofilních činidel včetně oximů (8).

Ukazuje se, že významným faktorem ovlivňujícím reaktivační účinnost testovaných oximů vůči tabunem či somanem inhibované AChE je jejich chemická struktura. Mezi nejvýznamnější strukturální faktory ovlivňující reaktivační účinnost oximů je počet methylenových skupin v řetězci spojujícím oba pyridiniové kruhy a dále poloha funkční oximové skupiny na pyridiniovém kruhu. Například pro reaktivaci tabunem inhibované AChE jsou nejvýhodnější tři až čtyři methylenové skupiny ve spojovacím můstku mezi oběma pyridiniovými kruhy a jedna až dvě oximové skupiny v poloze čtyři na pyridiniovém kruhu (3).

Dosud publikované výsledky prokazují, že se zatím nepodařilo nalézt širokospektrý oxim schopný s dostatečnou účinností reaktivovat fosfonylovanou AChE bez ohledu na chemickou strukturu NPL (12). Oxim HI-6 je sice výrazně účinným reaktivátorem somanem nebo cyklosinem inhibované AChE (13, 14), ale jeho schopnost reaktivovat tabunem inhibovanou AChE je mizivá (10, 12). Obidoxim je významným reaktivátorem fosforylované AChE v případě otravy sarinem nebo látkou VX (12), ale není schopen s dostatečnou účinností reaktivovat somanem nebo cyklosinem inhibovanou AChE (13, 14). Nově vyvinuté symetrické bispyridiniové oximy K074 a K075 jsou dostatečně účinné v případě reaktivity AChE inhibované látkou VX (16) a relativně účinné v případě reaktivity AChE inhibované tabunem (15), ale nejsou vhodnými reaktivátory AChE pro terapii otrav cyklosinem, protože jejich schopnost reaktivovat cyklosinem inhibovanou AChE je mizivá (18).

Oba nově syntetizované oximy by tedy mohly být přínosem pro antidotní terapii otrav tabunem, ale jejich přidání k antidotní terapii akutních otrav somanem by žádný efekt nepřineslo.

Poděkování

Autor děkuje M. Hrabínové a J. Uhlířové za technickou spolupráci.

Práce byla finančně podpořena účelovými prostředky výzkumného záměru FVZ0000501.

Literatura

1. BAJGAR, J. Present views on toxicodynamics of soman poisoning. *Acta Med.*, 1996, vol. 39, p. 101–105.
2. CABAL, J. – BAJGAR, J. Tabun – návrat po padesáti letech. *Chem. Listy*, 1999, vol. 93, s. 27–31.
3. CABAL, J. – KUČA, K. – KASSA, J. Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun inhibited acetylcholinesterase. *Pharmacol. Toxicol.*, 2004, vol. 95, p. 81–86.
4. CLEMENT, JG. – HANSEN, AS. – BOULET, CA. Efficacy of HLö-7 and pyrimidoxime as antidotes of nerve agent poisoning in mice. *Arch. Toxicol.*, 1992, vol. 66, p. 216–219.
5. CLEMENT, JG. – SHILOFF, JD. – GENNINGS, C. Efficacy of a combination of acetylcholinesterase reactivators, HI-6 and obidoxime, against tabun and soman poisoning of mice. *Arch. Toxicol.*, 1987, vol. 61, p. 70–75.
6. DAWSON, RM. Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *J. Appl. Toxicol.*, 1994, vol. 14, p. 317–331.
7. ELLMAN, GL., et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, vol. 7, p. 88–93.
8. ETO, M. Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry. Cleveland, USA, CRC Press, 1976.
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. Comparison of two oximes (HI-6 and obidoxime) in soman poisoning in rats. *Toxicology*, 1995, vol. 101, p. 167–174.
12. KASSA, J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 2002, vol. 40, p. 803–816.
13. 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* and *in vivo* methods. *Toxicology*, 1999, vol. 132, p. 111–118.

14. KASSA, J. – CABAL, J. A comparison of the efficacy of acetylcholinesterase reactivators against cyclohexyl methylphosphonofluoridate (GF agent) by in vitro and in vivo methods. *Pharmacol. Toxicol.*, 1999, vol. 84, p. 41–45.
15. KUČA, K. – CABAL, J. – MUSÍLEK, K. – JUN, D. – BAJGAR, J. Effective bisquaternary reactivators of tabun-inhibited AChE. *J. Appl. Toxicol.*, 2005, vol. 25, p. 491–495.
16. KUČA, K. – KASSA, J. Oximes-induced reactivation of rat brain acetylcholinesterase inhibited by VX agent. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2004, vol. 23, p. 167–171.
17. MARRS, TC. Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.*, 1993, vol. 58, p. 51–66.
18. MUSÍLEK, K. – LIPKA, L. – RAČÁKOVÁ, V. – KUČA, K. – JUN, D. – DOHNAL, V. – DOLEŽAL, M. New methods in synthesis of acetylcholinesterase reactivators and evaluation of their potency to reactivate cyclosarin-inhibited AChE. *Chem. Pap.*, 2006, vol. 60, no. 1, p. 48–51.
19. PUU, G. – ARTURSSON, E. – BUCHT, G. Reactivation of nerve agent inhibited acetylcholinesterase by HI-6 and obidoxime. *Biochem. Pharmacol.*, 1986, vol. 35, no. 9, p. 1505–1510.
20. ROUSSEAUX, CG. – DUA, AK. Pharmacology of HI-6, an H series oxime. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1989, vol. 67, p. 1183–1189.
21. TALLARIDA, R. – MURRAY, R. Manual of Pharmacological Calculation with Computer Programs. New York, Springer-Verlag, 1987. 145 p.
22. 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.
23. 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: Plk. prof. MUDr. Jiří Kassa, CSc.
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Katedra vojenské toxikologie
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: kassa@pmfhk.cz

Do redakce došlo 3. 8. 2006