

577.153.9.014[547—118]:616.153:616.831—092.9

INHIBICE ACETYLCHOLINESTERÁZY KRYŠÍ KRVE A MOZKU PINAKOLYLMETYL FLUOROFOSFONÁTEM

Npor. MUDr. Jiří BAJGAR, pplk. MUDr. Antonín JAKL, CSc.,
Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP v Hradci Králové

Pinakolylmetyl fluorofosfonát (PMFF) patří do skupiny vysoce toxických organofosfátů [14, 23]. Jeho účinek je založen na schopnosti inhibovat cholinesterázy a ostatní hydrolázy v nervových systémech živočichů. Jak vyplývá z metabolického modelu intoxikace organofosfáty [3], v mechanismu účinku záleží nejen na tom, ve kterém místě organismu látka působí, ale i na rychlosti jejího průniku do daného kompartmentu a na afinitě PMFF k acetylcholinesteráze (AChE, EC 3.1.1.7) v tomto místě.

Afinita PMFF k AChE byla studována převážně *in vitro* a bylo zjištěno, že PMFF je silným a nekompetitivním inhibitorem AChE [4, 5, 6, 15, 16]. Pro systém *in vivo* byla studována hlavně rychlost přeměny reaktivovatelné formy AChE na nereaktivovatelnou, tzv. stárnutí nebo „ageing“ [9, 10], a změny isoenzymů AChE a esteráz v některých orgánech krysy [22, 23]. Bylo zjištěno, že inhibice AChE v mozku koreluje jak s příznaky, tak s uhynutím pokusných zvířat [23]. Nejsou však známy práce o rychlosti inhibice AChE v různých částech mozku po účinku PMFF *in vivo*.

V této práci je sledována rychlost inhibice AChE v kryší krvi (jako transportním systémem) a ve čtyřech částech mozku (jako jedno z důležitých míst toxického účinku). Protože AChE, inhibovaná PMFF spontánně nereaktivuje [16], může být rychlost inhibice AChE považována za rychlost penetrace PMFF do různých oblastí mozku.

Materiál a metodika

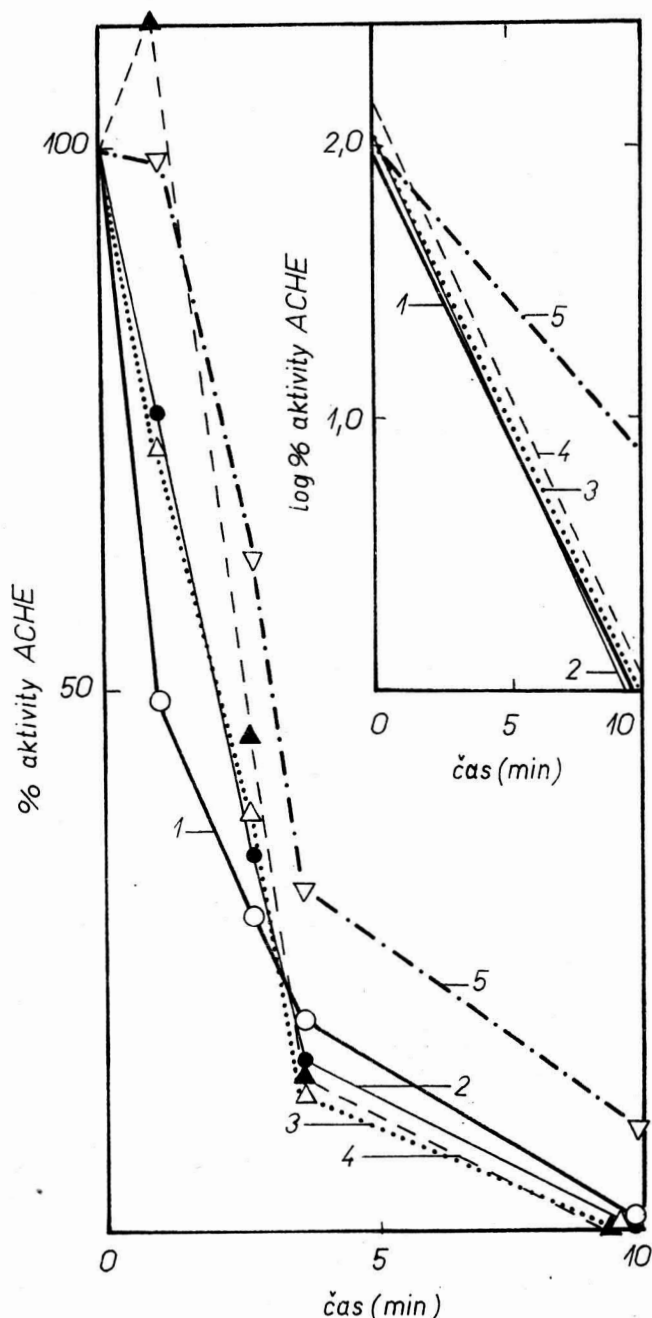
Kryší samice (farma Mezno), váhy 145—170 g, byly rozděleny do pěti skupin po 6 jedincích. Kontrolní skupině byl vstříknut i. m. fyziologický roztok, ostatním zvířatům PMFF v dávce 0,17 mg/kg. Pak byla zvířata po skupinách zabíjena podstřížením krčních cév v první minutě (období bez zřetelných příznaků otravy), ve 2.—3. minutě (první příznaky otravy — ztížené dýchání, drobné svalové záškuby), ve 3.—4. minutě (stadium křečí) po intoxikaci. Poslední skupinu tvořila zvířata, která zahynula kolem 9. minuty po podání PMFF.

Krev byla odebírána do nádobek z plastické hmoty a hemolyzována destilovanou vodou 1:20. Mozky byly vyňaty, opláchnuty fyziologickým roztokem a osušeny filtračním papírem. Po zmrazení na suchém ledu byly vypreparovány čtyři části: prodloužená mícha, pons, oblast bazálních ganglií a frontální kůra. Každá část byla homogenizována 1:10 [Janke et Kunkel, Ultra-Turrax, NSR] v 0.2 M tris-HCl pufru pH 7,6.

V hemolyzátech a hemogenátech částí mozku byla měřena aktivita AChE metodou podle Ellmana et al. [8] ve vlastní modifikaci [25]. Jako substrát byl použit acetylthiocholin jodid [Lachema Brno], jako chromogen 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová) kyselina (Serva, Heidelberg, NSR). Měření probíhala na přístroji Vitatron (Sci. Instr., Holland) při 412 nm. Aktivita AChE byla vyjádřena jako % kontrol. Statistické vyhodnocení bylo provedeno podle Hrašky a Tulacha [12] na počítači EPOS I.

Výsledky

Aktivita AChE v krevi po podání PMFF klesá velmi rychle. Již za minutu po podání, kdy ještě nejsou manifestovány první příznaky otravy, klesne aktivita asi na polovinu normální hodnoty. Charakter poklesu odpovídá semilogaritmické funkci — inhibice in vivo tedy probíhá podle kinetiky 1. řádu. V okamžiku smrti je aktivita AChE v krevi nulová (obr. 1).



Obr. 1

Změny aktivity AChE krevi krve a částí mozku po podání PMFF, bez transformace a v semilogaritmické transformaci (vpravo nahoře). Body znázorňují průměrné hodnoty % AChE aktivity. V semilogaritmické transformaci jsou pro přehlednost zakresleny pouze regresní přímky. 1 ○ — krev, 2 ● — prodloužená mícha, 3 △ — frontální kůra, 4 ▲ — pons, 5 ▽ — bazální ganglia

Podobný pokles byl pozorován i v prodloužené míše a frontální kůře mozku. Pokles aktivity je téměř tak rychlý jako v krevi, rozdíly mezi těmito částmi mozku a krevi nejsou statisticky významné ($p > 0,05$). V pontu a bazálních gangliích byla pozorována určitá doba latence, trvající asi jednu minutu. Po této době inhibice AChE nastupuje stejně rychle jako v předchozích dvou částech a v krevi (obr. 1).

Z průběhů závislosti snižování AChE aktivity na čase po podání PMFF bylo možné vypočítat z průběhu regresní přímky (obr. 1) poločasy inhibice — I_{50t} (doba, za kterou klesne AChE aktivita na polovinu původní hodnoty) a časy, kdy dochází k 99 %ní inhibici (I_{99t}). Tyto konstanty, charakterizující intoxikaci PMFF jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka 1

Konstanty charakterizující rychlost inhibice AChE v krevi a částech mozku při intoxikaci PMFF

Orgán	I_{50t} (min.)	I_{99t} (min.)
krev	1,3 (0,5–2,1)	9,4 (8,6–10,2)
prodloužená mícha	1,5 (0,9–2,1)	9,2 (8,7–9,8)
pons	2,0 (1,3–2,7)	10,1 (9,4–10,8)
frontální kůra	1,8 (1,2–2,5)	9,9 (9,2–10,6)
bazální ganglia	2,8 (1,8–3,9)	17,0 (15,9–18,1)

Diskuse

Z rychlosti inhibice AChE in vivo je možné odhadnout koncentraci PMFF ve sledovaném kompartmentu. Z literárních údajů je známa bimolekulární rychlostní konstanta inhibice (k_i) AChE uvedenou látkou in vitro (4, 16). Její velikost kolísá mezi $1–5 \times 10^7$ $\text{lit. mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Je možné předpokládat, že její velikost je in vivo stejná jako in vitro. Podle více autorů (1, 10, 24) je vztah mezi k_i , poločasem inhibice ($t_{0,5}$) a koncentrací inhibitoru $[I]$ dán:

$$k_i = \frac{\ln 2}{t_{0,5} \cdot [I]}$$

Za uvedeného předpokladu (rychlost inhibice in vitro a in vivo je tatáž) je možné za $t_{0,5}$ dosadit hodnotu zjištěnou in vivo — I_{50t} . Pak bude např. pro prodlouženou míchu platit:

$$1–5 \cdot 10^7 = \frac{0,6933}{1,5 \cdot [I]}$$

Neznámou je zde $[I]$, tj. koncentrace PMFF, nutná pro inhibici AChE s poločasem $t_{0,5} = 1,5$ min.

$$[I] = 0,92 – 4,6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

Podobným způsobem byly vypočteny koncentrace PMFF i pro ostatní sledované části (tabulka 2). Protože podaná dávka PMFF byla $9,3 \times 10^{-7}$ mol/kg , je možné konstatovat, že do mozku proniká jen asi 1 % injikované dávky. Toto odhadnuté množství nebylo možné konfrontovat s jinými autory. Údaje o distribuci PMFF v do-

Tabulka 2

Vypočtené koncentrace v jednotlivých částech mozku

Část mozku	Koncentrace PMFF . 10 ⁻⁸ M
prodloužená mícha	0,9—4,6
pons	0,7—3,5
frontální kůra	0,8—3,9
bazální ganglia	0,5—2,5

stupné literatuře nebyly nalezeny. Odhadnuté množství však souhlasí s údaji o distribuci jiných organofosfátů podobného typu, jako je např. DFP (20, 21) nebo isopropylmetyl fluorofosfonátu (17, 18, 19).

Velmi rychlá inhibice AChE v krvi po i. m. podání PMFF nasvědčuje tomu, že PMFF je vstřebán do oběhu téměř okamžitě. Jeho průnik hematoencefalickou bariérou je také téměř bez zpoždění. Rychlý průnik do mozku je podmíněn mimo jiné i lipofilností tohoto organofosfátu.

Na rozdíl od organofosfátů s atomem síry v molekule, které mají spíše periferní účinek (2, 3, 13), byl u PMFF vyznačen hlavně efekt na mozkovou AChE. Inhibice AChE v různých částech mozku však alespoň v prvních minutách intoxikace není uniformní. Nejrychleji je inhibována AChE prodloužené míchy. Protože mechanismus uhynutí při otravě PMFF je popisován především jako centrální selhání dechu, později i srdeční činnosti (7, 23), je velmi pravděpodobné, že pozorovaná inhibice AChE v prodloužené míše bude mít pro přežití či smrt organismu klíčový význam.

Poděkování

Autoři děkují paní Marii Zechovské a Radmile Táborské za technickou spolupráci.

Souhrn

Byly sledovány změny aktivity acetylcholinesterázy v krysí krvi a čtyřech částech mozku po podání 0,17 mg/kg pinakolyimetyl fluorofosfonátu. Rychlost inhibice acetylcholinesterázy v krvi, prodloužené míše, frontální kůře a pontu je dosti vysoká (hodnoty I_{50} jsou kolem 1—2 minut), což svědčí o rychlé penetraci sledované látky do uvedených částí mozku. Acetylcholinesteráza bazálních ganglií je inhibována podstatně pomaleji. Za předpokladu, že rychlost inhibice acetylcholinesterázy uvedenou látkou je in vitro a in vivo tatáž, byly vypočteny koncentrace pinakolyimetyl fluorofosfonátu, interagující s mozkovou acetylcholinesterázou, které se pohybují kolem 10^{-8} M, což je asi 1 % injikované dávky.

Literatura

- Aldridge, W. N.: Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl-p-nitrophenyl thiophosphate. *Biochem. J.* 46, 1950, 451—456.
- Bajgar, J.: Změny aktivity některých tkáňových hydroláz krysy při intoxikaci systoxem. *Sborník věd. prací VLVDÚ*, 36, 1968, 1955—195.
- Bajgar, J., Tulach, J., Jakl, A.: The differences in anticholinesterase action of some organophosphorus compounds (in vivo), Congress with International Participation, Industrial Neurology, June 1969, Prague, Abstract of Papers p. 4.
- Berry, W. K., Davies, D. R.: Factors influencing the rate of „ageing“ of a series of alkyl methylphosphonol-acetylcholinesterases. *Biochem. J.* 100, 1966, 572 až 576.
- Bošković, B., Maksimović, M., Minić, D.: Ageing and reactivation of acetylcholinesterase inhibited with soman and its thiocholine-like analogue. *Biochem. Pharmacol.* 17, 1968, 1738—1741.
- Coult, D. B., Marsh, D. J., Read, G.: Dealkylation studies on inhibited acetylcholinesterase, *Biochem. J.* 98, 1966, 869—873.
- De Candole, C. A., Douglas, W. W., Evans, C. L., Holmes, R., Spencer, K. E. V., Torrance, R. W., Wilson, K. M.: The failure of respiration in death by anticholinesterase poisoning. *Brit. J. Pharmacol.* 8, 1953, 466—475.
- Ellman, G. L., Courtney, D. K., Anders, V., Featherstone, R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 1961, 88—95.
- Fleisher, J. H., Harris, L. W.: Dealkylation as a mechanism for ageing of cholinesterase after poisoning with pinacolyl methyl phosphonofluoridate. *Biochem. Pharmacol.* 14, 1965, 641—650.
- Fleisher, J. H., Harris, L. W., Muriha, E. F.: Reactivation by pyridinium aldoxime methochloride (PAM) of inhibited cholinesterase activity in dogs after poisoning with pinacolyl methyl phosphonofluoridate (Soman). *J. Pharmacol.* 156, 1967, 345—351.
- Heilbronn, E.: Purification of cholinesterase from horse serum. *Biochim. Biophys. Acta*, 58, 1962, 222—230.
- Hraška, M., Tulach, J.: Příspěvek k automatizaci zpracování statistických dat v experimentální medicíně. *Záv. výzk. zpráva VLVDÚ*, 1966.
- Jakl, A.: Inhibiční efekt systoxu na cholinesterázu myši krve a mozku in vivo. *Pracov. Lék.* 20, 1968, 247—250.
- Koelle, G. B.: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1963, p. 449.
- Loomis, T. A., Johnson, D. D.: Ageing and reversal of soman induced effects on neuromuscular function with oximes in the presence of dimethyl sulfoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 8, 1966, 533—539.
- Patočka, J.: Kinetika ugnětěni cholinesteraz BFOV. *Sborník věd. prací VLVDÚ*, 25, 1967, 173—181.
- Polak, R. L., Cohen, E. M.: The influence of triorthocresylphosphate on the distribution of 32 P in the body of the rat after the injection of 32 P-sarin. *Biochem. Pharmacol.* 18, 1969, 813—820.
- Polak, R. L., Cohen, E. M.: The influence of oximes on the distribution of 32 P in the body of the rat after injection of 32 P-sarin. *Biochem. Pharmacol.* 19, 1970, 865—876.
- Polak, R. L., Cohen, E. M.: The binding of sarin in the blood plasma of the rat. *Biochem. Pharmacol.* 19, 1970, 877—881.
- Ramachandran, B. V.: Distribution of $DF^{32}P$ in mouse tissues. The effect of route of administration on incorporation and toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 15, 1966, 169—175.
- Ramachandran, B. V.: The influence of DFP, atropine and pyridiniumaldoximes on the rate of clearance of $DF^{32}P$ from the mouse circulatory system. *Biochem. Pharmacol.* 16, 1967, 2061—2068.
- Tulach, J., Benýšková, L.: Druhé rozdíly v afinitě hydroláz k O-pinakolyimetyl fluorofosfonátu. *Sborník věd. prací VLVDÚ*, 36, 1968, 51—61.
- Tulach, J., Benýšková, L.: Léčebné ovlivnění tkáňových cholinesteráz u experimentálních otrav pinakolyimetyl fluorofosfonátem. *Sborník věd. prací VLVDÚ*, 36, 1968, 75—84.
- Webb, J. L.: *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, vol. I., Acad. Press, New York and London, 1963, p. 541.
- Zechovská, M., Bajgar, J.: Mikrometoda pro stanovení cholinesterázy v krvi. 7. celostátní konference biochemických laborantů, Kladno 1970, str. 51—55.