

612.12[:577.153.9.014[:547—118)]]—083/—084

INHIBICE KREVŇÍ ACETYLCHOLINESTERÁZY SELETE NĚKTERÝMI ORGANOFOSFÁTY IN VITRO A IN VIVO

Npor. MUDr. Jiří BAJGAR, plk. doc. MUDr. Vladislav VONDRÁČEK, CSc.,
 pplk. ing. Miroslav SAJDA

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP v Hradci Králové

Toxický efekt organofosfátů (OF) je vysvětlován jejich schopností inhibovat hydrolytické enzymy, především acetylcholinesterázu (AChE, EC 3.1.1.7) v různých částech organismu. Z metabolického modelu intoxikace OF vyplývá, že při otravě těmito látkami je ve smyslu inhibice AChE nejdříve postižena brána vstupu a pak transportní systém, tj. krevní oběh (7, 22). V těchto systémech vytváří podaná látka také nejvyšší koncentraci. Inhibice AChE v krvi je kromě toho dosti přesnou mírou poškození organismu (1, 9, 10). Zejména při podání subletálních dávek by měl tento předpoklad platit v plné míře, protože koncentrace OF v organismu je tak nízká, že jeho velká část je spotřebována k inhibici cholinesteráz již v krevním oběhu a do ostatních částí proniká minimum. Bylo však dokázáno, že inhibice AChE je v jednotlivých orgánech při intoxikaci různými OF velmi odlišná (5, 7, 22). Dokonce není uniformní i pro tentýž OF v různých částech jednoho orgánu (4, 6). Z tohoto důvodu byla při intoxikaci třemi různými OF zkoumána aktivita AChE krve, která je současně prakticky jediným dostupným zdrojem pro klinicko-laboratorní vyšetření u otravy OF, a kde by se měl tedy účinek OF projevit nejdříve. Šlo o to, zda — i když inhibice AChE není v orgánech uniformní — je inhibice AChE v krvi pro všechny sledované OF dostatečně citlivým měřítkem otravy OF. Jako reprezentant OF byly vybrány tři vysoce toxické látky, které při intoxikaci inhibují AChE v různých orgánech zcela odlišným způsobem (4—7, 22). Aby bylo možné sledovat lépe dynamiku otravy, bylo použito perorálního podání, kdy je resorpce noxy zpomalena. Současně byl srovnáním údajů o inhibici AChE v krvi in vitro a in vivo proveden pokus o odhad koncentrace OF, vstřebaných do krevního oběhu.

Materiál a metodika

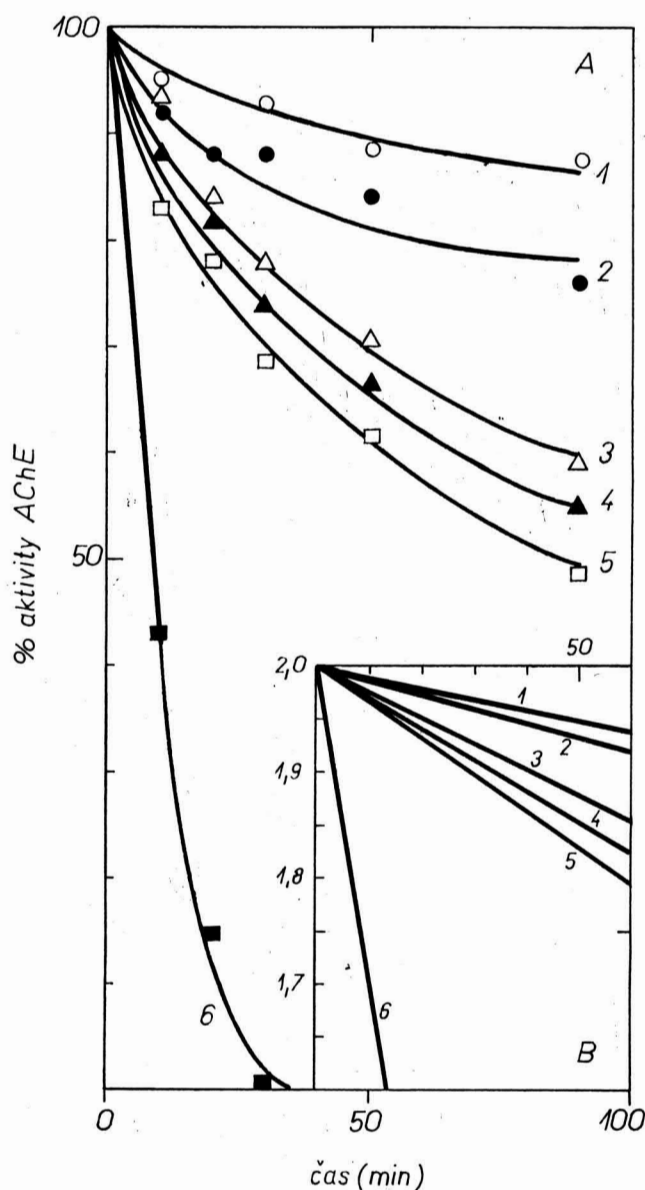
Pokusy in vivo

Selátům obojího pohlaví, váhy 10—16 kg, byly p. o. podávány tyto organofosfáty:

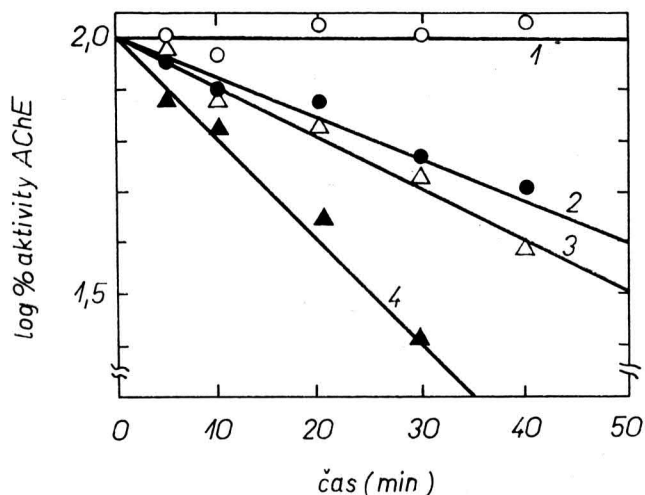
- a) O-ethyl-S-(2-dimethylaminoethyl)ester kyseliny metylthiofosforité (EDMM) v dávkách 3,0—4,0—5,0—6,0—10,0 a 300,0 mcg/kg (15).
 - b) O-isopropylmetyl fluorofosfonát (IMPF) v dávkách 0,3—3,0—7,0 a 10,0 mcg/kg (12).
 - c) O-pinakolylmetyl fluorofosfonát (PMPF) v dávkách 0,05—0,1—0,5 a 2,0 mcg/kg (11).
- Čísla v závorkách udávají počet zvířat intoxikovaných danou látkou.

Zpracování materiálu

Odběr krve byl prováděn z ušní vény do nádobek z plastické hmoty před podáním látky a pak v intervalech 5, 10, 20, 30, 50 a 90 minut po podání látky. Ve všech případech byly odebrány vždy dva vzorky a aktivita AChE vyjádřena jako

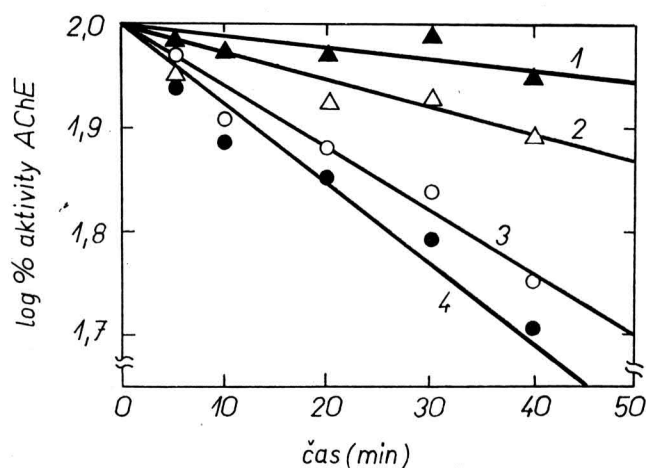


Obr. 1
 Inhibice krevní AChE selete v průběhu intoxikace EDMM bez transformace (A) a v semilogaritmické transformaci (B). Dávky EDMM: ○ (1) — 3,0, ● (2) — 4,0, △ (3) — 5,0, ▲ (4) — 6,0, □ (5) — 10,0, ■ (6) — 300,0 mcg/kg



Obr. 2

Inhibice krevní AChE selete v průběhu intoxikace PMPF v semilogaritmické transformaci. Dávky PMPF: ○ (1) — 0,05, ● (2) — 0,1, △ (3) — 0,5, ▲ (4) — 2,0 mcg/kg



Obr. 3

Inhibice krevní AChE selete v průběhu intoxikace IMPF v semilogaritmické transformaci. Dávky IMPF: ▲ (1) — 0,3, △ (2) — 3,0, ○ (3) — 7,0, ● (4) — 10,0 mcg/kg

jejich průměr. Měření aktivity AChE byla provedena v hemolýzátu krve destilovanou vodou 1:20 metodou podle Ellmana et al. [8] ve vlastní modifikaci [24]. Jako substrát byl použit acetylthiocholinjodid [Lachema Brno], jako chromogen 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová) kyselina [Serva, Heidelberg, NSR]. Měření probíhala na fotometru Vitatron (Sci. Instr., Holland) při 412 nm. Aktivita AChE byla vyjadřována jako % kontrol.

Pokusy in vitro

Inhibiční pokusy in vitro byly realizovány preinkubací známých molárních koncentrací OF s hemolýzátem od 2 selat obojího pohlaví a po 30 minutách byla měřena aktivita AChE.

Statistické vyhodnocení

K stanovení inhibičních konstant in vitro bylo použito probit-logaritmické transformace % inhibice AChE vs. koncentrace inhibitoru. Prolože-

ní přímek bylo provedeno metodou nejmenších čtverců na počítači MINSK 22 [15]. K hodnocení pokusů in vivo bylo použito regresní analýzy rozptylu a výpočty byly provedeny podle programů vypracovaných Vávrou [23].

Výsledky

Při perorální intoxikaci všemi sledovanými OF byla krevní AChE selete inhibována jednak v závislosti na dávce, jednak v závislosti na době od podání látky. Na obr. 1A je vidět průběh inhibice krevní AChE v čase při intoxikaci různými dávkami EDMM. V semilogaritmickém vynesení je závislost aktivity AChE na době od podání OF lineární (obr. 1B). Směrnice přímků pak udává velikost poklesu aktivity AChE v čase. Výsledky pro všechny sledované OF jsou znázorněny na obr. 1—3. Je zřejmé, že při nulové směrnici se aktivita AChE nemění. Ze závislosti regrese přímek na log. podané dávky je možné vypočítat

Tabulka 1

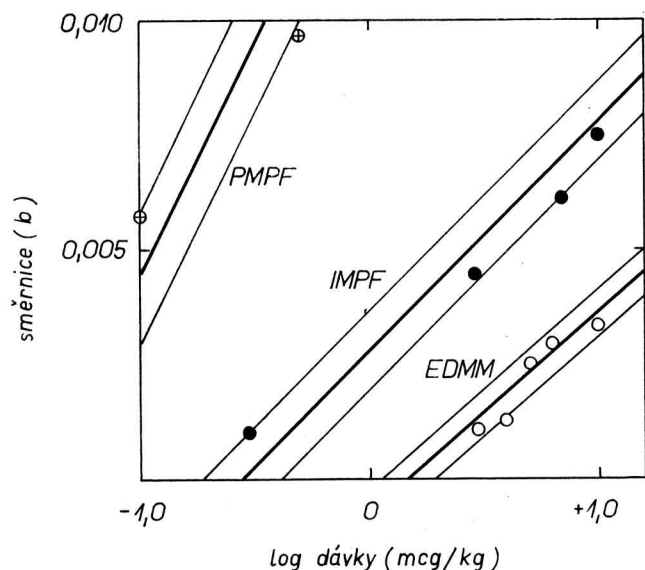
Vypočtené prahové dávky pro sledované OF, charakterizující jejich účinek in vivo:

a) prahová dávka byla stanovena výpočtem ze závislosti regrese poklesu aktivity vs. log podané dávky,

b) prahová dávka byla stanovena výpočtem ze závislosti % inhibice AChE v 90. minutě intoxikace vs. log dávky v molárním ekvivalentu

Látka	Prahová dávka			
	a)		b)	
	mcg/kg	mol/kg	mcg/kg	mol/kg
EDMM	1,44 (1,20—1,73)	$6,9 \times 10^{-9}$	1,05 (0,78—1,34)	$5,0 \times 10^{-9}$
PMPF	0,036 (0,029—0,044)	$2,0 \times 10^{-10}$	0,024 (0,017—0,038)	$1,3 \times 10^{-10}$
IMPF	0,27 (0,19—0,38)	$1,9 \times 10^{-9}$	0,21 (0,14—0,28)	$1,5 \times 10^{-9}$

Obr. 4



Stanovení prahové dávky pro sledované OF ze závislosti směrnice vs. log dávky

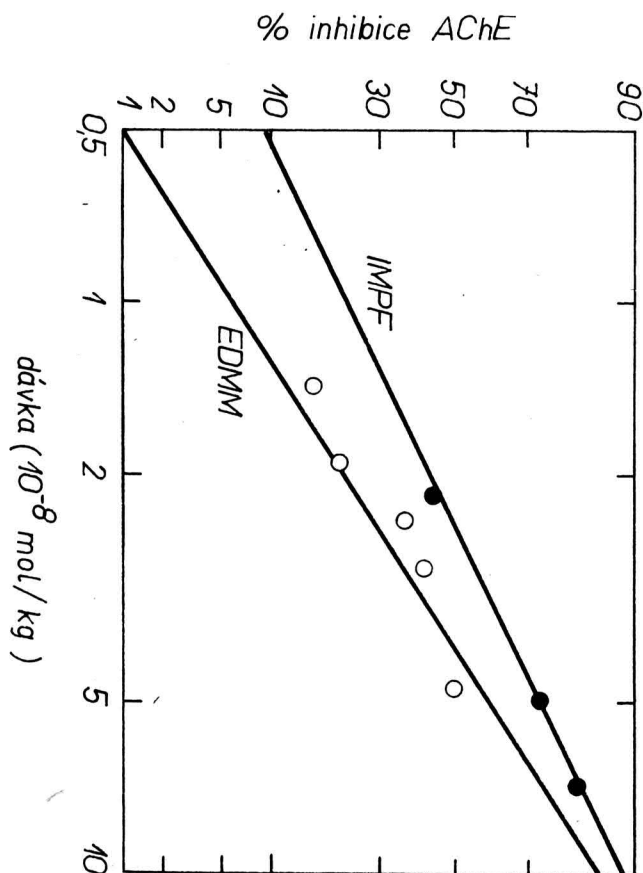
dávku odpovídající nulové směrnici, tedy prahovou dávku — I_{0D} (obr. 4). Vypočtené prahové dávky pro sledované látky jsou uvedeny v tabulce I.

Pro všechny tři OF bylo dosaženo rovnovážného stavu inhibice AChE (tj. stav, kdy se inhibice AChE mění již minimálně) v 90. minutě po podání látky. Stupeň inhibice AChE je v této době závislý pouze na koncentraci OF. Při vynesení % inhibice AChE (za 90 minut po podání OF) proti molárnímu ekvivalentu podané dávky (mol/kg) v probit-logaritmické transformaci bylo opět možné určit prahovou dávku. Protože v tomto případě však byla vypočtena extrapolací z probit-logaritmické transformace, nejde o dávku působící nulovou inhibicí, ale o dávku působící zanedbatelnou inhibicí AChE (1%), I_{01D} . Na obr. 5 je tento vztah dokumentován pro dva sledované OF, v tabulce I jsou shrnuty prahové dávky, vypočtené oběma výše uvedenými způsoby.

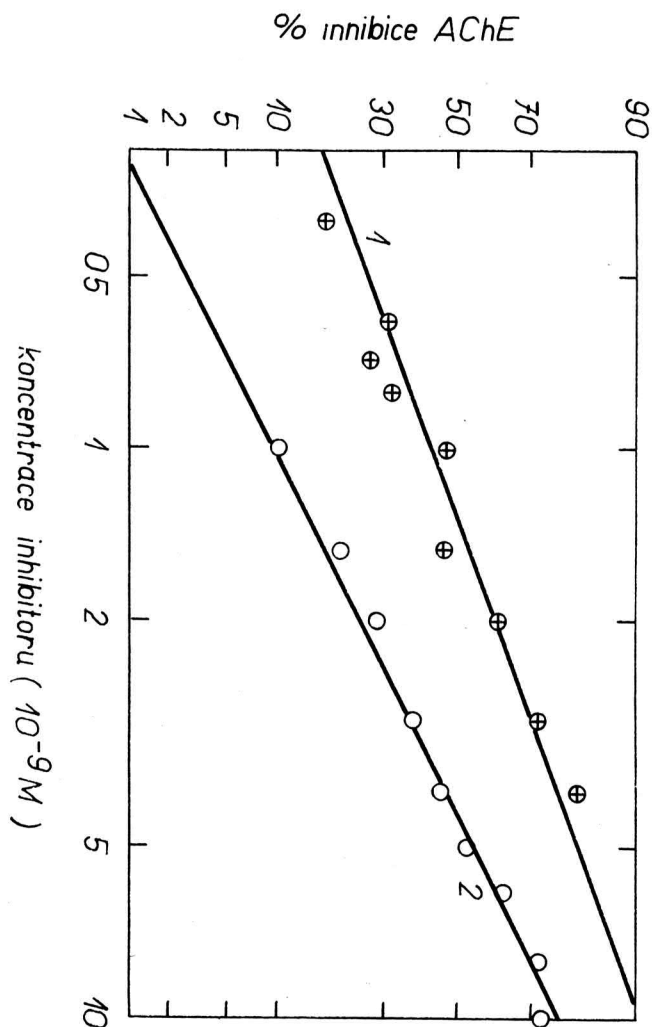
Na obr. 6 je vidět průběh inhibice AChE krve

Obr. 6

Obr. 5



Stanovení prahové dávky ze závislosti % inhibice AChE v 90. minutě intoxikace vs. log dávky v molárním ekvivalentu



Inhibice krevní AChE selete PMPF (1) a EDMM (2) in vitro

selete EDMM a PMPF in vitro. Z těchto výsledků je možné odečíst koncentraci inhibitoru, působící in vitro 1 % a 50 %, inhibice (I_{01} a I_{50}). I_{01} je obdobou prahové dávky v podmínkách in vitro, I_{50} reprezentuje konstantu, která se pro daný typ inhibitoru blíží velikosti disociační konstanty komplexu enzym-inhibitor (12). Velikosti obou konstant, které charakterizují účinek sledovaných OF in vitro, jsou uvedeny v tabulce II.

Tabulka II

Inhibiční konstanty interakce krevní AChE selete se sledovanými OF in vitro

Látka	I_{50} (M)	I_{01} (M)
EDMM	$4,3 \times 10^{-9}$ (3,2—5,8)	$3,2 \times 10^{-10}$ (2,5—4,3)
PMPF	$1,3 \times 10^{-9}$ (0,9—1,8)	$2,3 \times 10^{-11}$ (1,2—4,8)
IMPF	$5,2 \times 10^{-9}$ (3,6—7,1)	$1,0 \times 10^{-10}$ (0,5—1,9)

Ani pro jeden sledovaný OF nebyly pozorovány při podání uvedených dávek manifestní klinické příznaky intoxikace.

Diskuse

Z výsledků je zřejmé, že všechny tři OF při p. o. podání působí inhibici AChE v krvi, a to i při podání poměrně nízkých dávek bez manifestních příznaků otravy. Přitom je inhibice AChE v orgánech u otrav sledovanými OF dosti odlišná: Při podání ekvivalentních dávek všech tří sledovaných OF krysám byla pozorována pro EDMM nejvyšší inhibice v bránici a mezižeberních svalech, nejnižší v mozku (5, 7). Pro PMPF byla naopak inhibice AChE v bránici minimální a v mozku dosahovala 100 % (4, 7, 22); v tomto orgánu byla sledována AChE ještě v pontu, prodloužené míše a frontální kůře, kde také dosahovala 100 %, na rozdíl od bazálních ganglií, kde byla pozorována inhibice jen asi 80–90 % (4). Pro IMPF byl pozorován (3) u křesy podobný obraz inhibice AChE v orgánech jako pro PMPF, ale selektivní inhibice v částech mozku byla vyjádřena jak u křesy (3), tak u myši (6) mnohem zřetelněji. Z našich výsledků vyplývá, že obraz inhibice AChE v krvi je pro sledované OF velmi podobný a liší se jen kvantitativně — dávkou podle použití OF.

Při srovnání koncentrací PMPF působící 1 % inhibice AChE v krvi in vitro s dávkou, která AChE v krvi již nealteruje, je vidět, že za předpokladu homogenního rozptýlení OF v těle, kdy je dávka vyjádřena jako koncentrace (mol/kg), činí koncentrace pro stejný efekt in vitro asi 10–20 % z dávky in vivo. Pro další dva sledované OF je tento poměr nižší, jen asi 5–10 %. Tento poměr je zároveň vyjádřením koncentrace OF inhibující AChE v krvi, protože vždy jde o nekompetitivní inhibitory AChE (2, 11, 16, 17, 21). Ze srovnání inhibičních konstant in vitro a in

vivo je možné usuzovat, že koncentrace OF, inhibující AChE v krvi je řádově 10^{-10} — 10^{-11} M. Skutečná koncentrace OF v krvi bude vyšší, protože část OF je spotřebována na inhibici nespecifických esteráz a na vazbu s proteiny (13, 18–20), popř. je kromě EDMM detoxikována (14) a část proniká do jiných systémů, kde je OF buď metabolizován (játra, ledviny), nebo působí mechanismem inhibice cholinesteráz v periferním či centrálním nervovém systému vlastní toxický efekt.

Z výsledků je možné uzavřít, že i když se klinicky při uvedených dávkách otrava manifestně neprojevuje a nekončí exitem, je inhibice AChE v krvi značná a může tedy sloužit jako velmi dobré měřítko pro diagnostiku zasažení organismu OF.

Souhrn

Byla sledována aktivita krevní acetylcholinesterázy selete v průběhu perorální intoxikace subletálními dávkami těchto organofosfátů: O-etyl-S-[2-dimethylaminoethyl]ester kyseliny metylthiofosforitě, O-pinakolylylmetyl fluorofosfonát, O-isopropylmetyl fluorofosfonát. Žádná z uvedených látek nepůsobila manifestní klinické příznaky otravy a vždy byla inhibována aktivita krevní acetylcholinesterázy. Ze závislosti velikosti inhibice tohoto enzymu na velikosti podané dávky byly vypočteny prahové dávky pro sledované látky. Prahové dávky byly porovnány s koncentracemi působícími tutéž inhibici acetylcholinesterázy in vitro. Bylo zjištěno, že pro stejný efekt in vivo je nutno vytvořit 5krát — 20krát vyšší koncentraci organofosfátu než in vitro. Výsledky potvrzují, že inhibice krevní acetylcholinesterázy je velmi dobrým měřítkem pro diagnostiku zasažení organismu organofosfáty.

Poděkování

Autoři děkují s. Marii Zechovské a Evě Vodákové za velmi dobrou technickou spolupráci.

Literatura

1. Aldrich, F. D.: Cholinesterase assays: their usefulness in diagnosis of anticholinesterase intoxications. *Chem. Toxicol.* 2, 1969, 445–448.
2. Aldridge, W. N.: The inhibition of erythrocyte cholinesterase by triesters of phosphoric acid. *Biochem. J.* 54, 1953, 442–444.
3. Bajgar, J.: Časová dynamika změn aktivity acetylcholinesterasy při experimentální intoxikaci O-isopropylmethyl fluorofosfonátem. *Sborník věd. prací VLVDÚ*, 44, 1969, 57–69.
4. Bajgar, J., Jakl, A.: Inhibice acetylcholinesterázy křesy krve a mozku pinakolylylmetyl fluorofosfonátem. *Voj. zdrav. listy*, 39, 1970, 253–255.
5. Bajgar, J., Tulach, J., Patočka, J., Jakl, A.: The inhibition of acetylcholinesterase by two different organophosphorus compounds in vivo. 7th International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Riga 1970, Abstract A-92, p. 192.
6. Bajgar, J.: Inhibition of acetylcholinesterase in different parts of the brain of mice by isopropylmethyl phosphonofluoridate in vitro and in vivo. *Arch. Toxicol.* 27, 1971, 233–241.

7. Bajgar, J., Tulach, J., Jakl, A., Patočka, J.: The differences in anticholinesterase action of some organophosphorus compounds in vivo. *Acta biol. med. Germ.*, v tisku.
8. 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.
9. Jakl, A.: Klinicko-laboratorní diagnostika otrav BOF v polních podmínkách. *Sborník věd. prací VLVDÚ*, 49, 1970, 63—74.
10. Jakl, A.: Dealkylace inhibované cholinesterázy a její význam pro klinicko-laboratorní diagnostiku otrav BOF. *Sborník věd. prací VLVDÚ*, 49, 1970, 75—88.
11. Jandorf, J. B., Michel, H. O., Schaffer, N. K., Egan, R., Summerson, W. H.: The mechanism of reaction between esterases and phosphorus containing anti-esterases. *Disc. Faraday Soc.* 20, 1955, 134—142.
12. Myers, D. K.: Studies on cholinesterases. 7. Determination of the molar concentration of pseudocholinesterase in serum. *Biochem. J.* 51, 1952, 303—311.
13. Novgorodskaja, A. M., Rozegart, V. I., Ščerbak, I. G.: Raspredělenije fosfororganického inhibitora cholinesterázy LG 63 v organizme krysa pri rozličnyh putjach vvedenija. *Vopr. Med. Chim.* 14, 1968, 288—294.
14. Ornst, F.: Enzymatická detoxikace BOF. Kandidátská disertační práce, Hradec Králové VLVDÚ, 1967.
15. Patočka, J., Tulach, J.: Využití samočinných počítačů v enzymatické kinetice. 5. celostátní biochemický sjezd, Brno 1969, Abstrakt p. 38.
16. Patočka, J., Tulach, J.: Interaction of O-ethyl-S-(2-dimethylaminoethyl)-methyl thiophosphonate with acetylcholinesterase. *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* 34, 1969, 3191—3195.
17. Patočka, J.: Inhibition effect of isopropylmethyl phosphonofluoridate on tissue cholinesterases of mouse, rat and guinea-pig. *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, v tisku.
18. Polak, R. L., Cohen, E. M.: The influence of triorthocresylphosphate on the distribution of ^{32}P in the body of the rat after injection of ^{32}P -sarin. *Biochem. Pharmacol.* 18, 1969, 813—820.
19. 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.
20. Polak, R. L., Cohen, E. M.: The binding of sarin in the blood plasma of the rat. *Biochem. Pharmacol.* 19, 1970, 877—881.
21. Tulach, J., Benýšková, L.: Druhé rozdíly v afinitě hydroláz k O-pinakolylmetyl fluorofosfonátu. *Sborník věd. prací VLVDÚ*, 36, 1968, 51—61.
22. Tulach, J., Jakl, A., Patočka, J., Bajgar, J.: Inhibice cholinesteráz somanem a její význam v mechanismu otravy. *Sborník věd. prací VLVDÚ*, 1, 1969, 103—147.
23. Vávra, J.: Cit. podle: Katalog programů na samočinné počítače. VLVDÚ Hradec Králové, 1969.
24. Zechovská, M., Bajgar, J.: Mikrometoda pro stanovení cholinesterázy v krvi. 7. celostátní konference biochemických laborantů, Kladno 1970, p. 51—55.