

612.82.015.2[:577.153.9.014.04.024]—083

**REAKTIVACE IZOPROPYL-METYLFOSFONOFLUORIDÁTEM INHIBOVANÉ
LIDSKÉ MOZKOVÉ ACETYLCHOLINESTERÁZY OXIMY IN VITRO***

Jiří PATOČKA

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav J. E. Purkyně v Hradci Králové

Věnováno k 50. narozeninám plk. doc. MUDr. V. Vondráčka, CSc.

* Část práce byla přednesena na sedmém zasedání Federation of European Biochemical Societies, Varna 1971.

Interakce cholinesteráz s organofosforovými sloučeninami vede ke vzniku inaktivních enzymů, ve kterých je esteratická strana aktivního centra, tvořená hydroxylovou skupinou serinu, ireverzibilně fosforylována [33]. Spontánní reaktivace takto fosforylovaných cholinesteráz účinkem vody je většinou velmi pomalá [24]. Účinkem některých sloučenin nukleofilnějších než voda, jako jsou např. oximy či hydroxamové kyseliny, probíhá defosforylace cholinesteráz měřitelnými rychlostmi [32]. Tyto látky označujeme jako reaktivátory cholinesteráz. Mezi nejúčinnější reaktivátory patří kvarterní deriváty 2- a 4-pyridinaldoxidu [14, 16, 17].

Z velkého počtu známých reaktivátorů doznaly jen některé praktického použití i v humánní medicíně jako antidota při otravách organofosforovými sloučeninami. Jsou to 2-pyridinaldoxid methojodid (pralidoxim, 2-PAM), 1, 3-bis-(4-pyridinaldoxid) propan dibromid (trimedoxim, TMB-4) a 1, 3-bis-(4-pyridinaldoxid)-2-oxa-propan dichlorid (obidoxim, Toxogonin^R, LÜH 6) [viz např. 18].

I když se zdá, že výzkum v této oblasti zatím nevede k nalezení nových účinnějších látek, je této problematice věnována stále značná pozornost, jak o tom svědčí řada prací z poslední doby [viz např. 2, 7, 8, 12, 19, 25].

Vedle průzkumu nových látek je výzkum zaměřen hlavně na hledání vztahů mezi účinností reaktivátorů a jejich chemickou strukturou [5 až 8, 12]. Výzkum této problematiky je soustředěn do oblasti molekulární biochemie a farmakologie, tzn., že je zkoumán účinek reaktivátorů na fosforylované cholinesterázy in vitro. Nejčastěji používanými zdroji enzymu jsou lidská či koňská plazmová cholinesteráza [EC 3.1.1.8] [13, 30] a lidská nebo hovězí erytrocytární acetylcholinesteráza [EC 3.1.1.7] [1, 7, 8, 10—13, 29]. Malá pozornost je zatím věnována acetylcholinesteráze mozkové [2, 3, 20], která je při organofosforové intoxikaci klíčovým enzymem, poněvadž stupeň jejího poškození je v přímé korelaci s klinickým stavem organismu [18].

Tato práce si všímá účinku několika vybraných reaktivátorů na lidskou mozkovou acetylcholinesterázu inhibovanou izopropyl-metylfosfonofluoridátem. Poněvadž výsledky získané na lidském materiálu jsou důležité pro přenášení terapeutických zkušeností z laboratorních zvířat

na člověka a v dostupné literatuře zcela chybí, má tato práce za cíl doplnit naše vědomosti v tomto směru.

POKUSNÁ ČÁST**Materiál**

Acetylcholinesteráza: Jako zdroje acetylcholinesterázy bylo použito homogenátu nucleus caudatus lidského mozku. Asi 5g vzorky tkáně zbavené vizuálně bílé hmoty byly získány z pitvného materiálu (dva muži, 36 a 40 let, dopravní nehoda). Vzorky byly odebrány asi 24 hodin po smrti a pak ihned homogenizovány ve veronal-fosfátovém pufru o pH 8,0 izotonizovaném chloridem sodným [22] na 10 % homogenát (Ultra-Turrax, Janke a Kunkel).

Reaktivátory — 2-pyridinaldoxid methojodid (pralidoxim) o b. t. 219 °C* (literatura udává 218—219 °C, cit. [9]) a 1, 3-bis-(4-pyridinaldoxid) propan dibromid (trimedoxim) b. t. 241 °C (literatura udává b. t. 238—241 °C, cit. [28]) byly výrobky n. p. Léčiva, Praha. 1, 3-bis-(4-pyridinaldoxid)-2-oxa-propan dichlorid (obidoxim) byl připraven postupem popsáným Lüttringhausem a Hagedornovou [21] a měl b. t. 212 °C (literatura [15] udává b. t. 212 °C). 1, 1-bis-(4-pyridinaldoxid) metan dibromid (MMB-4) byl připraven kvarternizací 4-pyridinaldoxidu dibrommetanem a měl b. t. 235 °C. 1-(4-pyridinaldoxid)-3-dietylmetylamoniumpropan dibromid (BI-100) byl připraven postupem popsáným Bielavským [4] a měl b. t. 209—211 °C (literatura [23] udává b. t. 180—192 °C). 1, 4-bis-(4-pyridinaldoxid)-2-trans-buten dibromid (bieloxim) byl připraven postupem popsáným v práci Patočky a spol. [27] a měl b. t. 255—257 °C. Ostatní použité chemikálie byly výrobky n. p. Lachema, Brno.

Metody

Příprava izopropyl-metylfosfonylované acetylcholinesterázy [25] a její reaktivace: 1 ml 10% mozkového homogenátu byl smísen s 1 ml

* Všechny látky tály za rozkladu. Body tání nejsou korigovány.

1×10^{-8} M roztokem izopropyl-metylfosfonofluoridátu a tato směs byla inkubována při 25°C 30 minut. Za tuto dobu bylo dosaženo asi 90% inhibice. Potom byl k inkubační směsi přidán 1 ml roztoku reaktivátoru o vhodné koncentraci a po t minutách inkubace při 25°C byla směs doředěna veronal-fosfátovým pufrům [22] na celkový objem 20 ml. Po přidání 1 ml 0,1 M acetylcholinjodidu byla změřena zbytková aktivita acetylcholinesterázy. Během inhibice i reaktivity bylo udržováno pH 8,0. Měření aktivity acetylcholinesterázy: Enzymatická aktivita byla měřena elektrometrickou metodou [22] na poloautomatickém zařízení s přímým zápisem. Měření probíhalo při 25°C a jako substrátu bylo použito acetylcholin jodidu ve výsledné koncentraci $4,76 \times 10^{-3}$ M.

Ke každé sérii měření byla kromě aktivity reaktivovaného enzymu (a_r) měřena ještě aktivita neinhibovaného enzymu (a_o), kdy místo roztoku izopropyl-metylfosfonofluoridátu byl k enzymu přidán 1 ml základního pufru a aktivita inhibovaného enzymu (a_i), kdy místo roztoku reaktivátoru byl přidán 1 ml základního pufru.

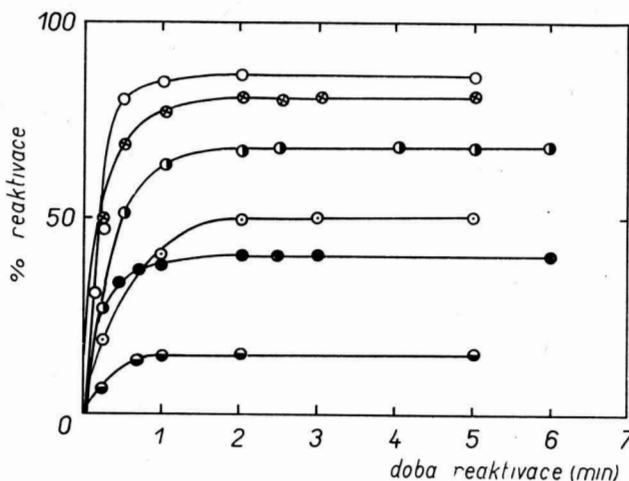
Zpracování výsledků: Ze získaných hodnot aktivit bylo vypočteno procento reaktivovaného enzymu podle vzorce

$$\text{procento reaktivity} = 100 \times \frac{a_o - a_i}{a_o - a_r}$$

Vynesením procenta reaktivity proti molární koncentraci reaktivátoru v probit-logaritmické transformaci byly získány přímky, z nichž metodou regresní analýzy byly počítány koncentrace reaktivátoru dávající požadovaný efekt. Všechny výpočty byly provedeny na samočinném počítači MINSK-22.

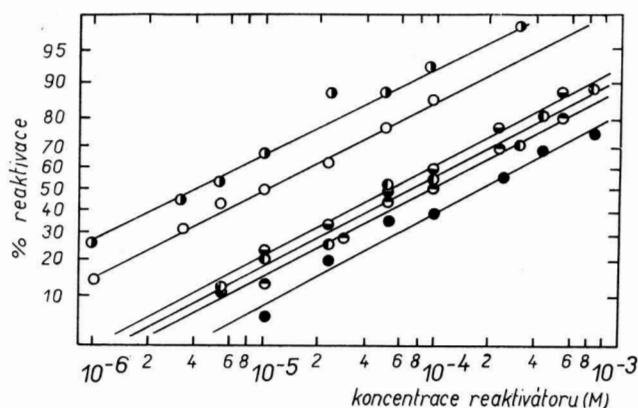
Výsledky

Závislost reaktivity na době preinkubace inhibovaného enzymu s reaktivátorem: Z časového průběhu reaktivity je zřejmé, že tato reakce je poměrně rychlá. Jak je vidět z typické ukázky závislosti procenta reaktivity na době preinkubace reaktivátoru s fosfonylovaným enzymem (obr. 1), je dosaženo rovnovážného, dále se již neměničícího stavu, během jedné až dvou minut u všech sledovaných reaktivátorů. Rychlost reaktivity izopropyl-metylfosfonylované lidské mozkové acetylcholinesterázy je větší než u izopropyl-metylfosfonylované hovězí erytrocytární acetylcholinesterázy [25] a reaktivity pravděpodobně neprobíhá typickou pseudomonomolekulární kinetikou, poněvadž rychlost reaktivity je prakticky nezávislá na koncentraci reaktivátoru. Závislost reaktivity na koncentraci reaktivátoru: Pro sledování závislosti reaktivity na koncentraci použitého reaktivátoru byla volena u všech oximů pětiminutová inkubační doba reaktivátoru s inhibovaným enzymem. Tato doba je zcela dostatečná pro dosažení maximálního stupně reaktivity. Závislosti procenta reaktivity na koncentraci reaktivátorů jsou symetrické



Obr. 1
Časová závislost reaktivity izopropyl-metylfosfonylované lidské mozkové acetylcholinesterázy oximy.

○ — 1.10^{-4} M obidoxim, ○ — 1.10^{-5} M obidoxim,
⊕ — 4.10^{-4} M pralidoxim, ○ — 1.10^{-5} M trimedoxim,
● — 1.10^{-4} M bieloxim, ○ — 1.10^{-5} M BI-100



Obr. 2
Reaktivity izopropyl-metylfosfonylované lidské mozkové acetylcholinesterázy oximy. Závislost na koncentraci při 5 min. inkubaci reaktivátoru s fosfonylovaným enzymem.
○ — trimedoxim, ○ — obidoxim, ○ — MMB-4, ○ — pralidoxim, ○ — BI-100, ● — bieloxim

sigmoidní křivky, které se dají linearizovat převedením do probit-logaritmické transformace (obr. 2). Z těchto závislostí byly počítány koncentrace reaktivátoru, které vyvolávají 10%, 50% a 90% reaktivaci za uvedených podmínek. Hodnoty těchto konstant označené symboly R_{10} , R_{50} a R_{90} jsou uvedeny v tabulce I.

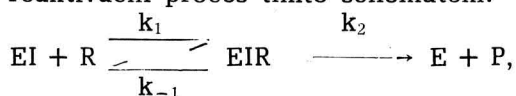
Tabulka I

Reaktivční účinnost šesti oximů na izopropyl-metylfosfonylované lidské mozkové acetylcholinesteráze

Oxim	R_{10} μM	R_{50} μM	R_{90} μM
trimedoxim	0,21	4,0	68,0
obidoxim	0,60	10,0	160,0
MMB-4	3,6	53,0	700
pralidoxim	4,5	61,0	910
BI-100	5,9	85,0	1200
bieloxim	12,0	165	2000

Diskuse

Podle současných představ je možno popsat reaktivační proces tímto schématem:



kde EI je inhibovaný enzym, R je reaktivátor, EIR přechodný komplex, E regenerovaný enzym a P jsou produkty reakce. k_1 , k_{-1} a k_2 jsou příslušné rychlostní konstanty. Rychlost reaktivace je dána vztahem

$$v = -\frac{d[EI]}{dt} = k_2[EIR].$$

Vzhledem k tomu, že byla nalezena jen malá závislost rychlosti reaktivace na koncentraci reaktivátoru, je pravděpodobně koncentrace přechodného komplexu EIR zanedbatelná ve srovnání s velikostí k_2 a lze se tedy domnívat, že $v \approx k_2$. Rychlost reaktivace je tedy téměř nezávislá na koncentraci reaktivátoru a na jeho koncentraci závisí jen stupeň reaktivace daný poměrem mezi inhibovaným a reaktivovaným enzymem. Koncentrace reaktivátoru, při které dochází k 50% reaktivaci (R_{50}) a kdy je tedy polovina enzymu ve formě EI a polovina enzymu ve formě E (koncentrace EIR je zanedbatelná), představuje kinetickou konstantu reakce. Vzhledem k tomu, že $k_2 \gg k_{-1}$, je tato konstanta dána vztahem

$$K = R_{50} = -\frac{k_2}{k_1}$$

Za těchto podmínek je velikost R_{50} nejen mírou afinity reaktivátoru k inhibovanému enzymu, ale i mírou jeho reaktivační účinnosti.

Účinnost reaktivátorů vyjádřená velikostí R_{50} klesá v řadě: trimedoxim, obidoxim, MMB-4, pralidoxim, BI-100 a bieloxim. Překvapující je poměrně malá účinnost obou posledních oximů (BI-100 a bieloxim), které při pokusech s hovězí erytrocytární acetylcholinesterázou inhibovanou izopropylmethylfosfonofluoridátem vykazovaly vyšší účinnost než trimedoxim [25, 27].

Z rovnoběžnosti přímek závislosti procenta reaktivace na koncentraci reaktivátoru v probit-logaritmické transformaci (obr. 2) lze usuzovat na stejný mechanismus reakce u všech studovaných látek. Velikost empirického Hillova koeficientu (n) počítaná z rovnice

$$(R_{90}/R_{10})^n = 81$$

se u všech reaktivátorů pohybuje kolem 0,8.

Mohutná reaktivační účinnost trimedoximu není omezena jen na lidskou mozkovou acetylcholinesterázu inhibovanou izopropylmethylfosfonofluoridátem. Podobné výsledky byly získány i při reaktivaci izopropylmethylfosfonylo-

vané krysí mozkové acetylcholinesterázy [26]. Ze čtyř studovaných reaktivátorů byl trimedoxim nejúčinnější. Dále pak následovaly reaktivátory v pořadí BI-100, obidoxim a pralidoxim [26].

Ze získaných výsledků vyplývá, že lidská mozková acetylcholinesteráza inhibovaná izopropylmethylfosfonofluoridátem je in vitro rychle a dobře reaktivovatelná oximy. O léčebném efektu těchto látek bude tedy rozhodovat především rychlost s jakou budou pronikat do míst s poškozeným enzymem (především do CNS) a jakou zde vytvoří koncentraci.

Souhrn

Byla zkoušena reaktivační účinnost šesti oximů na lidské mozkové acetylcholinesteráze (homogenát nucleus caudatus) inhibované izopropylmethylfosfonofluoridátem. U každého oximu byla měřena závislost procenta reaktivace na molární koncentraci oximu (doba reaktivace = 5 min.) a z těchto závislostí byly počítány koncentrace reaktivátoru vyvolávající 50% reaktivaci (R_{50}). Byly naměřeny tyto hodnoty R_{50} : 4 μ M pro 1,3-bis-(4-pyridinaldoxidim)-propan dibromid, 10 μ M pro 1,3-bis-(4-pyridinaldoxidim)-2-oxapropan dichlorid, 53 μ M pro 1,1-bis-(4-pyridinaldoxidim)-metan dibromid, 61 μ M pro 2-pyridinaldoxidim methiodid, 85 μ M pro 1-(4-pyridinaldoxidim)-3-dietylmethylamoniumpropan dibromid a 165 μ M pro 1,4-bis-(4-pyridinaldoxidim)-2-trans-buten dibromid. Všechny pokusy byly konány při 25 °C a pH 8,0.

Autor děkuje O. Ochrymovičovi za technickou spolupráci.

Literatura

1. Ashani, Y., Edery, H., Zahavy, J., Künberg, W., Cohen, S.: Reactivators of inhibited acetylcholinesterase. I. The preparation and properties of 4-hydroxyimino-methyl-1-methyl pyrimidinium iodide. Israel. J. Chem. 3, 1965, 133–142.
2. Back, P.: Zur Reaktivierung der Acetylcholinesterase und Cholinesterase. Z. klin. Chem. klin. Biochem. 7, 1969, 301–305.
3. Balaševa, E. K., Kartaševa, N. V., Rozengart, V. I.: Issledovanie svojstv novych reaktivatorov cholinesterazy iz klassa efirov oksiminouksusnoj kisloty. Biochimija 33, 1968, 29–33.
4. Bielavský, J.: Syntéza biskvarterních monoaldoxidimů. Sborník věd. prací VLVDÚ Hradec Králové, 38, 1969, 173–184.
5. Dirks, E., Scherer, A., Schmidt, M., Zimmer, G.: Beziehung zwischen chemischer Struktur und Cholinesterase-reaktiveringender Wirkung bei einer Reihe neuer unsymmetrischer Pyridiniumsalze. I. Derivate des 4-Hydroxyiminomethylpyridin. Arzneim.-Forsch. 20, 1970, 55–62.
6. Dirks, E., Scherer, A., Schmidt, M., Zimmer, G.: Beziehung zwischen chemischer Struktur und Cholinesterase-reaktiveringender Wirkung bei einer Reihe neuer unsymmetrischer Pyridiniumsalze. II. Derivate des 2-Hydroxyiminomethylpyridin. Arzneim.-Forsch. 20, 1970, 197–200.
7. Franchetti, P., Grifantini, M., Martelli, S.: Structure-activity relations in organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase reactivators. II. Methiodides of hydroxyimino derivatives of 1-pyridyl-2-phenylethanes. J. Pharm. Sci. 58, 1969, 857–860.
8. Franchetti, P., Grifantini, M., Stein, M. L.: Structure-activity relations in organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase reactivators. III. Methiodides of hydroxyimino derivatives of pyridylethanes. J. Pharm. Sci. 59, 1970, 710–711.
9. Green, A. L., Saville, B.: The reaction of oximes with

- isopropyl methylphosphonofluoridate (sarin). J. Chem. Soc. 1956, 3887—3900.
10. Green, A. L., Smith, H. J.: The reactivation of cholinesterase inhibited with organophosphorus compound. 1. Reactivation by 2-oxoalldoximes. Biochem. J. 68, 1958, 28—31.
 11. Green, A. L., Smith, H. J.: The reactivation of cholinesterase inhibited with organophosphorus compound. 2. Reactivation by pyridinealldoxime methiodides. Biochem. J. 68, 1958, 32—35.
 12. Grifantini, M., Martelli, S., Stein, M. L.: Structure-activity relations in organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase reactivators. I. Methiodides of new mono- and dioximes with pyridine nucleus. J. Pharm. Sci. 58, 1969, 460—464.
 13. Heilbronn, E.: Action of fluoride on cholinesterase. II. In vitro reactivation of cholinesterases inhibited by organophosphorus compounds. Biochem. Pharmacol. 14, 1965, 1363—1373.
 14. Hobbiger, F., O'Sullivan, D. G., Sadler, P. W.: New potent reactivators of acetylcholinesterase inhibited by tetraethyl pyrophosphate. Nature 182, 1958, 1498 až 1499.
 15. Christensen, I.: Hydrolysis of bis- (4-hydroxyimino-methyl-1-pyridiniummethyl) ether dichloride (Toxogonin^R). I. Decomposition products. Acta pharmac. Suecica 5, 1968, 23—36.
 16. Kewitz, H., Wilson, I. B.: A specific antidote against lethal alkylphosphate intoxication. Arch. Biochem. Biophys. 60, 1956, 261—263.
 17. Kewitz, H., Wilson, I. B., Nachmansohn, D.: A specific antidote against lethal alkylphosphate intoxication. II. Antidotal properties. Arch. Biochem. Biophys. 64, 1956, 456—465.
 18. Koelle, G. B.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Cholinesterases and Anticholinesterase Agents. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1963. p. 910—911.
 19. Kuhn, H.: Die Wirkung eines neuen monoquartären pyridiniumoxims auf ungehemmte und durch hochtoxische Organophosphate gehemmte Acetylcholinesterase in vitro. Arzneim.—Forsch. 20, 1970, 774—776.
 20. Lee, R. M., Pickering, W. R.: The toxicity of haloxon to geese, ducks and hens, and its relationship to the stability of the di-(2-chloroethyl) phosphoryl cholinesterase derivatives. Biochem. Pharmacol. 16, 1967, 941—948.
 21. Lüttringhaus, A., Hagedorn, I.: Qartere Hydroxyimino-methylpyridinium Salze. Arzneim.—Forsch. 14, 1964, 1—5.
 22. Michel, H. O.: An electrometric method for determination of red blood cells and plasma cholinesterase activity. J. Lab. Clin. Med. 34, 1949, 1564—1568.
 23. Nishimura, T., Yamazaki, C., Ishiura, T.: Antidotes for organophosphate poisoning. I. Synthesis of 1-(quaternary ammonium)-3-(hydroxyiminomethylpyridinium) propane dibromides. Bull. Chem. Soc. Japan 40, 1967, 2434—2436.
 24. O'Brien, R. D.: Toxic Phosphorus Esters. Academic Press, New York and London, 1960.
 25. Patočka, J.: Kinetics of reactivation of isopropyl-methylphosphonylated bovine erythrocyte acetylcholinesterase by bisquaternary pyridinemalldoximes. Coll. Czech. Chem. Commun. 36, 1971, 2690—2695.
 26. Patočka, J.: Reactivation of isopropyl-methylphosphonylated rat brain acetylcholinesterase by oximes in vitro. Coll. Czech. Chem. Commun. V tisku.
 27. Patočka, J., Bielavský, J., Ornst, F.: Reactivating effect of α,ω -bis-(4-pyridinealldoxime)-2-trans-butene dibromide on isopropyl-methylphosphonylated acetylcholinesterase. FEBS Lett. 10, 1970, 182—184.
 28. Poziomek, E. J., Hackley, B. E., Steinberg, G. M.: Pyridinium alldoximes. J. Org. Chem. 23, 1958, 714—717.
 29. Reiner, E.: Oxime reactivation of erythrocyte cholinesterase inhibited by ethyl p-nitrophenyl ethyl phosphonate. Biochem. J., 97, 1965, 710—714.
 30. Wang, E. I. C., Braid, P. E.: Oxime reactivation of diethylphosphoryl human serum cholinesterase. J. Biol. Chem. 242, 1967, 2683—2687.
 31. Webb, J. L.: Enzyme and Metabolic Inhibitors. Vol. I. Academic Press, New York and London, 1963. p. 20.
 32. Wilson, I. B.: Acetylcholinesterase. XIII. Reactivation of alkyl-phosphate inhibited enzyme. J. Biol. Chem. 199, 1952, 113—120.
 33. Wilson, I. B. v knize: The Enzymes. Vol. IV. Academic Press, New York and London, 1960. p. 514.