

615.778-092.23-092.9-092.6

PROBLEMATIKA PŘENOSU TOXICITY VYSOCE ÚČINNÝCH ORGANOFOSFÁTŮ Z LABORATORNÍHO ZVÍŘETE NA ČLOVĚKA

Kpt. MUDr. Jiří BAJGAR, CSc., RNDr. Jiří PATOČKA,

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav J. E. Purkyně, Hradec Králové

Nebezpečí chemické války zůstává stále aktuální a spektrum látek použitelných jako možné bojové chemické látky se stále rozšiřuje intenzivním výzkumem, zejména v kapitalistických státech (Edgewood Arsenal v USA, Porton v Anglii, Rijswijk v Holandsku, Sundbyberg ve Švédsku ap.). Vývoj nových, stále toxičtějších látek s sebou proto přináší potřebu řešit ochranu jednotlivců i celých skupin obyvatelstva či vojsk před jejich účinkem. Jedním z nutných předpokladů pro posouzení aktuálního nebezpečí té které látky je však znalost její toxicity pro člověka. Tyto údaje nejsou experimentálně přístupné a usuzovat na ně můžeme buď z nahodilých otrav nebo z modelových pokusů, provedených na zvířatech, které extrapolujeme na člověka. To ovšem předpokládá detailní znalost mechanismu účinku i dějů, které ho ovlivňují, jako je např. distribuce, detoxikace apod. Vzhledem k množství faktorů ovlivňujících toxicitu látky pro organismus je snahou při převádění výsledků ze zvířat na člověka zvolit pokud možno jednoduchý model, který by zahrnoval jen ty faktory, které jsou z hlediska přežívání organismu nejdůležitější.

Z vojenského hlediska je možno považovat

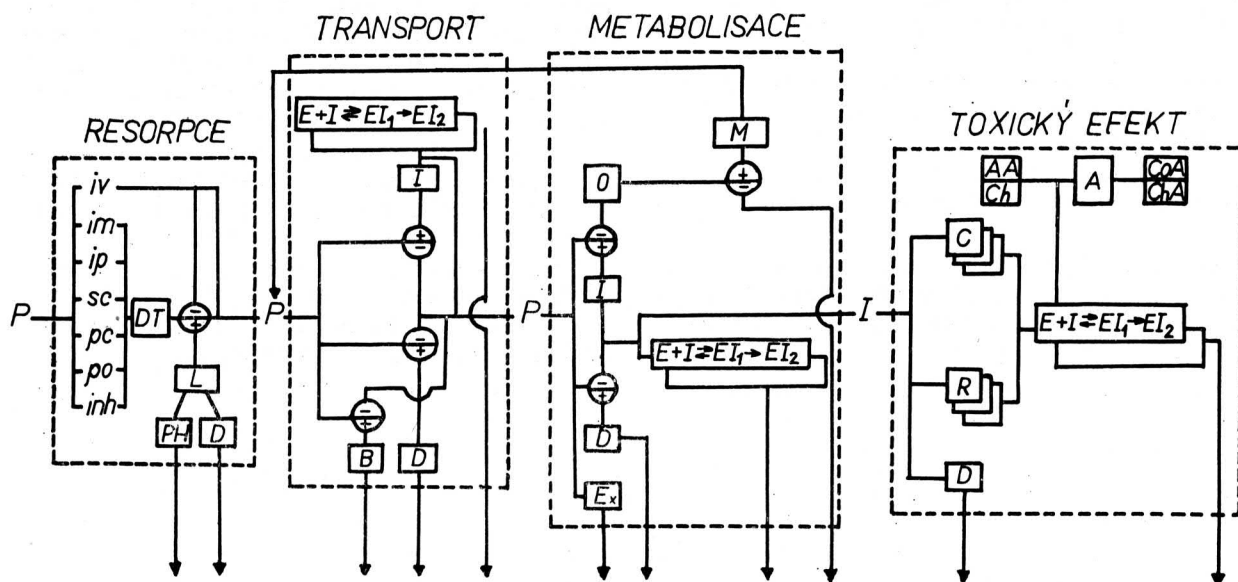
za nejnebezpečnější a pro potenciální použití nejrealnější skupinu organofosfátů (OF), které jsou běžně ve výzbroji armád kapitalistických států pod různým kódovým označením (8). Přestože tyto látky jsou známy poměrně dlouho, jejich udávaná toxicita pro člověka byla spíše výsledkem empirických spekulací a odhadů bez dostatečných teoretických podkladů. Přitom jsou tyto látky z hlediska přenosu ideální, neboť mají zcela jednoduchý a uniformní spouštěcí mechanismus účinku. Ten spočívá v inhibici cholinesteráz v nervovém systému živočichů (5).

Termín cholinesterázy označuje skupinu enzymů, hydrolyzujících cholinové estery. Z hlediska funkční důležitosti je možno je zhruba rozdělit na pseudocholinesterázy (BuChE, EC 3.1.1.8), vyskytující se zejména v plazmě a játrech, s funkcí neznámou, a acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7), vyskytující se hlavně v erytrocytech a mozku, ev. v některých elektrických orgánech ryb. Funkce AChE spočívá v hydrolytickém štěpení acetylcholinu, který je uvolňován při přenosu nervového vzruchu v cholinergním nervovém systému. OF inhibují jak BuChE, tak AChE, přičemž afinita různých OF k tomu či onomu enzymu může

být značně rozdílná. Modelování tohoto děje lze provést na základě schématu, uvedeného na obr. 1.

Celé schéma představuje organismus. Čtverce nebo obdélníky znázorňují buď možné děje nebo jejich lokalizaci, nebo jsou to odpovědi na otázky rozhodovacích bloků, znázorněných jako kroužky.

mentu i exkrecí (Ex). Jako inhibitor — I — vstupuje OF na místo toxického efektu. Minimálně jde alespoň o dva vícekompartmentové oddíly, periferní (R) a centrální (C) nervový systém. Inhibitor reaguje opět minimálně s dvěma druhy enzymů, AChE a BuChE, opět na reverzibilní či ireverzibilní komplex-enzym-inhibitorový. Enzym sám působí štěpení acetyl-



Obr. 1. Zjednodušené schéma účinku OF. Bližší vysvětlení v textu

OF vstupuje do organismu různými cestami a dostává se při i. v. podání ihned do transportního systému, do krevního oběhu. Při jiných způsobech podání je jeho vstup do oběhu opožděn, což je na schématu vyjádřeno jako DT. Při této cestě dochází ke ztrátám (L) buď detoxikací (D), nebo fyzikálně (PH), např. vydýcháním při inhalační otravě, absorpcí na potravu při p. o. podání nebo odpařením na kůži při p. c. intoxikaci. V oběhu je nebo není detoxikován a je nebo není inhibitorem cholinesteráz (I). Tento poslední rozhodovací blok bude důležitý u látek, které se teprve po metabolizaci stávají účinnější noxou z hlediska schopnosti inhibice cholinesteráz. Je-li látka inhibitor, její určitá část reaguje s enzymy v oběhu (E), minimálně s erytrocytární AChE a plazmovou BuChE na reaktivovatelnou formu (EI_1), eventuálně na nereaktivovatelný komplex EI_2 . Tato část OF je tedy z dalšího postupu opět ztracena. A konečně může určitá část OF reagovat s nespecifickými látkami (B). Oběhem je OF zanesen do místa metabolismu a toxického efektu. Pro větší názornost jsou tyto děje znázorněny na schématu za sebou, i když probíhají současně. Látka při tom buď je inhibitorem, a může se takto uplatnit v místě toxického efektu, nebo inhibitorem není, a musí být metabolizována v některých orgánech (O) na vlastní účinnou látku. Po této metabolizaci je vyplavována zpět do oběhu a prochází opět stejnými cestami. Ztráty jsou způsobeny opět detoxikací a v tomto kompart-

mentu cholinu [A], vzniklého z acetylkoenzymu A (CoA) a cholinacetyltransferázy [ChA] a cholinu [Ch], na kyselinu octovou [AA] a Ch. Při inhibici cholinesteráz není ACh hydrolyzován a jeho nahromadění vede k toxickému efektu. Tento další děj již není na schématu znázorněn.

Z uvedeného schématu vyplývá, že na toxicitu daného OF budou mít vliv především

— ztráty OF při průniku na místo toxického efektu a

— afinita cholinesteráz k danému typu OF.

Výsledným efektem bude různý stupeň inhibice cholinesteráz v životně důležitých strukturách, na němž bude záviset stav intoxikovaného organismu. Různý stupeň poškození cholinesteráz vede k nahromadění ACh a k vyvolání různě těžkých projevů intoxikace. Stupeň inhibice cholinesteráz je dobrým diagnostickým měřítkem pro posouzení tíže intoxikace. Je nutno však mít na zřeteli, že inhibice krevních cholinesteráz je sice diagnosticky dobře přístupná, ale že není podstatou toxického efektu. Ten je dán stupněm poškození AChE v nervovém systému, což však zase není možno diagnosticky využít.

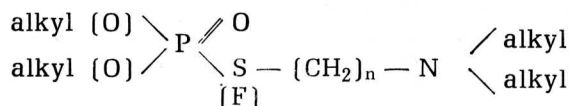
Za předpokladu určitého zjednodušení, jako je např. předpoklad stejného způsobu podání, distribuce a detoxikace, můžeme za faktor určující toxicitu považovat afinitu cholinesteráz k danému OF. Tato afinita je velmi dobře měřitelná v pokusech in vitro, např. jako kon-

centrace inhibitoru, která za stanovenou dobu inkubace enzymu s inhibitorem způsobí 50 % inhibice enzymu. Tuto koncentraci označujeme symbolem I_{50} ; záporný dekadický logaritmus této koncentrace značíme pI_{50} .

Při hledání vztahu struktury a účinku byla sledována otázka závislosti toxicity daného OF na afinitě k izolovanému enzymu. Výsledky těchto prací závisely na tom, zda sledované OF byly chemicky příbuzné a zda bylo použito vhodného enzymu jako modelu (2, 3, 7, 10). Pokusili jsme se provést podobnou korelaci toxicity OF s jeho afinitou k BuChE či AChE s vybranými OF, které patří do skupiny vysoce účinných insekticid či potenciálně použitelných bojových chemických látek.

Materiál a metodika

Soustředili jsme se na skupinu látek obecného vzorce



Do této skupiny patří převážná část nejtoxictějších OF, jako jsou klasické bojové OF typu sarin a soman a nejnovější OF ze skupiny V-látek. V práci bylo použito jak našich, tak i dosažitelných literárních údajů, zahrnujících jejich základní toxicitní údaje, vyjádřené velikostí LD_{50} i. m., přepočtené na molární koncentrace ($\mu\text{mol/kg}$) a afinitní konstanty, vyjádřené velikostí I_{50} , resp. pI_{50} . Afinitní konstanty byly měřeny in vitro na plazmové BuChE a mozkové či erytrocytární AChE krysy nebo myši. Veškeré citace týkající se tohoto materiálu jsou shrnuty v práci Bajgara, 1968 [9] a pro obsáhlost nejsou uváděny.

Měření interakce afinitních konstant interakce O-izopropylmethylfluorofosfonátu (IMPF) a O-pinakolylmethylfluorofosfonátu (PMPF) psí, morčecí a lidské mozkové AChE bylo provedeno na poloautomatickém zařízení, dříve popsaném [6].

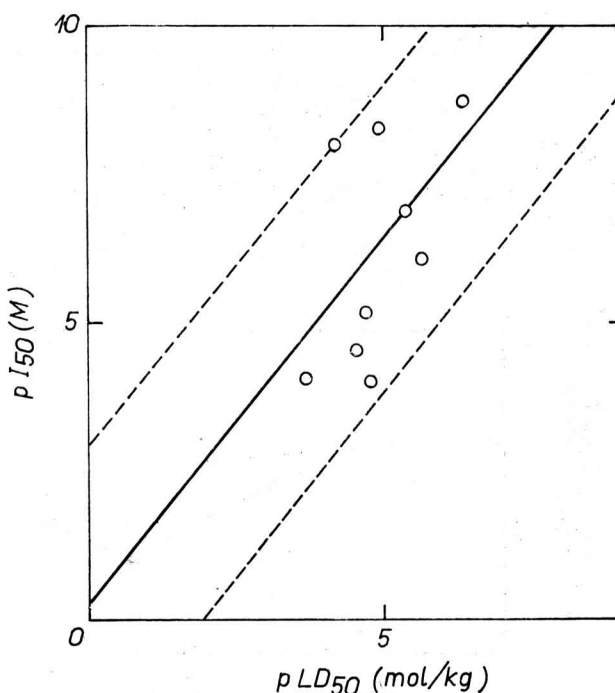
Všechny afinitní konstanty byly převedeny na výraz pI_{50} , toxicitní na pLD_{50} (záporný dekadický logaritmus velikosti LD_{50}).

Korelace afinitních a toxicitních konstant a její statistické vyhodnocení bylo provedeno na samočinném počítači MINSK 22 metodou regrese analýzy podle příslušných programů [4].

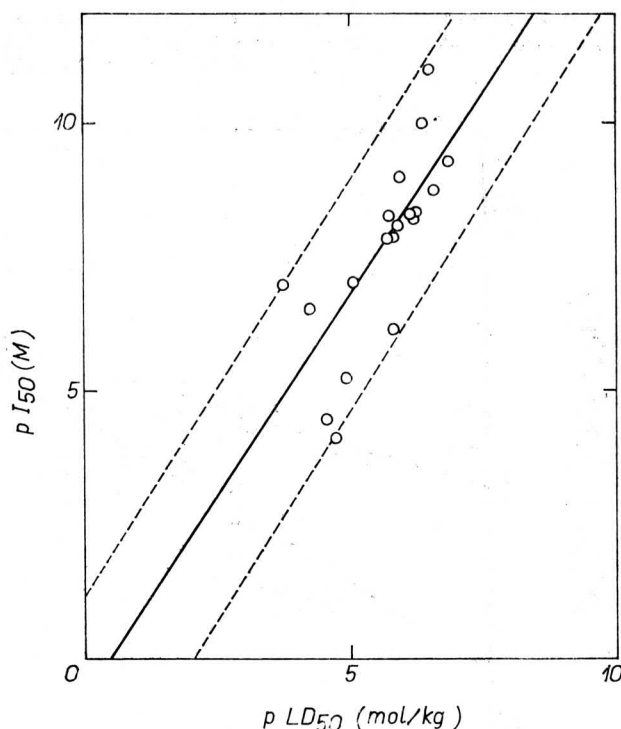
Výsledky a diskuse

Na obr. 2 jsou vyneseny hodnoty pLD_{50} proti hodnotám pI_{50} interakce sledovaných OF s plazmovou BuChE. Korelace zde nebyla prokázána, což svědčí o tom, že aktivita plazmové BuChE není faktorem rozhodujícím o životě organismu intoxikovaného OF.

Na obr. 3 jsou vyneseny zmíněné hodnoty pLD_{50} proti hodnotám pI_{50} interakce sledovaných OF s AChE, mozkovou či erytrocytární.



Obr. 2. Vztah mezi toxicitou různých OF (vyjádřenou jako pLD_{50}) a jejich schopností inhibovat BuChE (vyjádřenou jako pI_{50}). Rovnice: $y = 0,32 + 1,23 x$, $r_{xy} = 0,5395$, $p > 0,05$



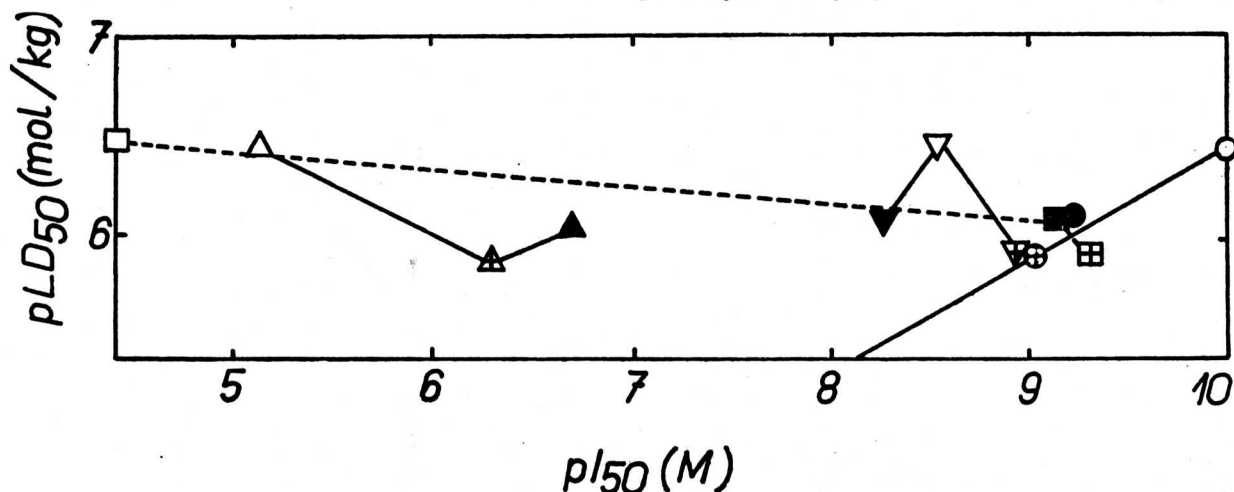
Obr. 3. Vztah mezi toxicitou různých OF (vyjádřenou jako pLD_{50}) a jejich schopností inhibovat AChE (vyjádřenou jako pI_{50}). Rovnice: $y = -0,93 + 1,53 x$, $r_{xy} = 0,7727$, $p < 0,05$

V tomto případě byl prokázán statisticky významný ($p < 0,05$) vztah mezi těmito dvěma veličinami. Tento nálezk svědčí o významu AChE při intoxikaci OF. Vzhledem k tomu, že byla nalezena korelace mezi in vitro naměřenou afinitou k AChE a in vivo stanovenou toxicitou,

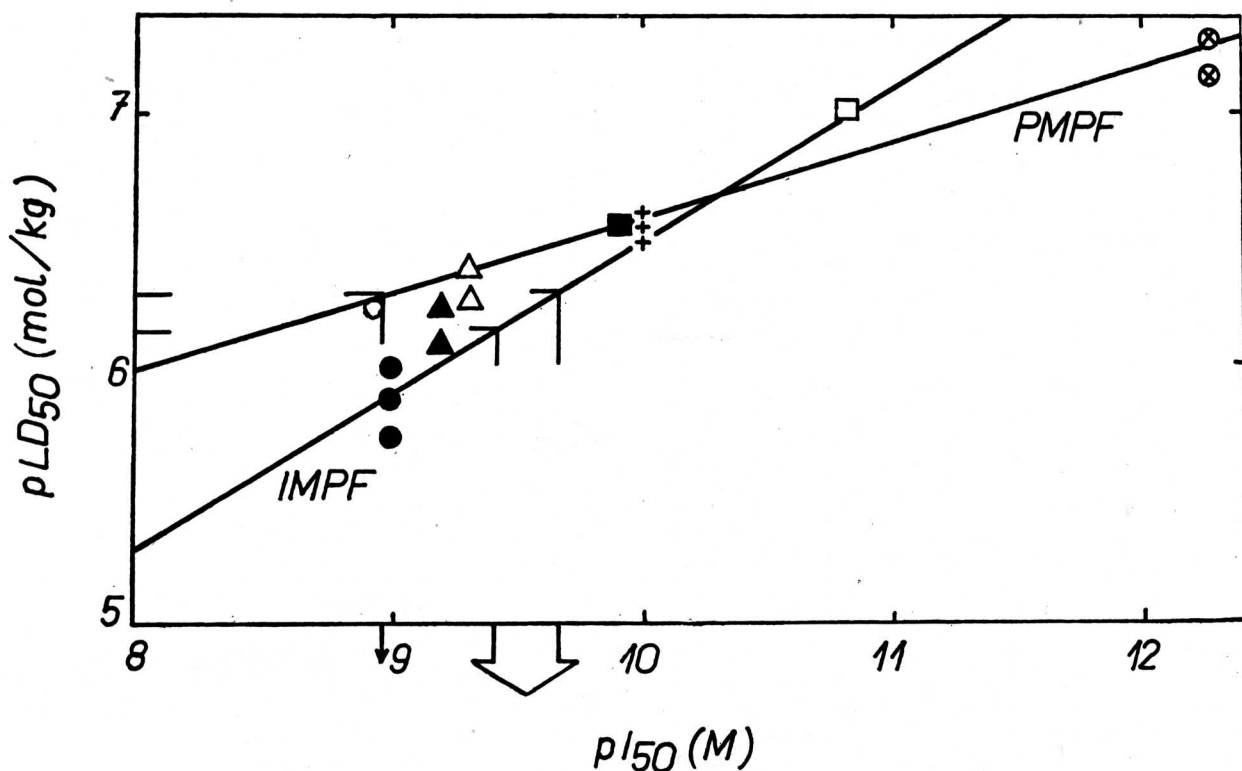
lze předpokládat, že podobná korelace by mohla být nalezena mezi hodnotami LD_{50} a I_{50} pro jeden OF na několika druzích laboratorních zvířat. Pro ověření tohoto předpokladu byly vybrány dva OF — IMPF a PMPF.

Nálezy podporující tuto hypotézu jsou shrnuty na obr. 4. Tato korelace byla prokázána jen pro AChE mozku; u AChE přítomné v ostatních orgánech (srdce, plíce, játra) byla korelace nevýznamná.

Ze závislosti tohoto druhu je možné — známe-li jednu veličinu, např. pl_{50} — vypočítat i druhou (pLD_{50}) a naopak. Poněvadž hodnota pl_{50} je experimentálně snadno přístupná, můžeme tak předpovědět velikost pLD_{50} i pro takové druhy, kdy toxicitní experimenty nepřicházejí v úvahu. Je to tedy způsob, který vede ke stanovení toxicity na základě statisticky prokázané pravděpodobnosti, což je mnohem přesnější než jakýkoliv odhad. Na obr. 5 je



Obr. 4. Vztah mezi toxicitou IMPF a jeho schopností inhibovat AChE různých orgánů myši, krysy a morčete. Tvar bodů označuje AChE různých orgánů: $\circ$, $\bullet$, $\oplus$ — mozek, ∇ , $\blacktriangledown$, $\triangledown$ — srdce, $\square$, $\blacksquare$, $\boxplus$ — plíce, $\triangle$, $\blacktriangle$, $\triangleleft$ — játra, výplň bodů označuje AChE druhů: $\triangle$, $\square$, ∇ , $\circ$ — morče, $\blacktriangle$, $\blacksquare$, $\blacktriangledown$, $\bullet$ — krysa, $\triangleleft$, $\boxplus$, $\triangledown$, $\oplus$ — myš



Obr. 5. Určení toxicity IMPF a PMPF pro člověka, známe-li hodnoty pl_{50} pro lidskou mozkovou AChE (označeny šipkami). Tvar bodů označuje AChE různých druhů: $\triangle$, $\blacktriangle$ — krysa, $\circ$, $\bullet$ — myš, $\square$, $\blacksquare$ — králík, $\circ$ — pes, $+$ — morče; výplň bodů označuje OF: $\blacktriangle$, $\bullet$, $\blacksquare$, $+$ — IMPF, $\triangle$, $\circ$, $\square$, $\oplus$ — PMPF.

Rovnice pro vztah toxicity a inhibiční účinnosti pro IMPF: $y = 0,42 + 0,61 x$ $r_{xy} = 0,9409$ $p < 0,05$;
 PMPF: $y = 3,59 + 0,3 x$ $r_{xy} = 0,9462$ $p < 0,05$.

demonstrováno určení toxicity IMPF a PMPF pro člověka, která činí při i. m. podání 4,9 až 7,4 mg/70 kg pro IMPF a 6,6 mg/70 kg pro PMPF.

Velikost této konstanty umožňuje odhad i extrémně malých či vysokých dávek, což má význam např. při určování norem či maximálně přípustných dávek apod.

Může se namítnout, že takto odvozená hodnota toxicity není kontrolovatelná a má pouze spekulativní charakter. Je však možno konfrontovat naše údaje s některými publikovanými fakty z náhodných otrav OF.

Toxicita IMPF, vyjádřená jako LD₅₀ pro člověka při p. o. podání, je udávána asi 14 až 35 mg/70 kg. Při aplikaci na spojivky je velikost LD₅₀ udávána 0,05 mg/kg, tj. 3,5 mg/70 kg. Při inhalačním podání je velikost LD₅₀ kolem 4–8 mg/70 kg. Údaje pro PMPF tak bohaté nejsou; při inhalační bráně vstupu je dávka LD₅₀ PMPF asi 2–4 mg/70 kg, při p. c. zasažení kolem 50 mg/70 kg (11). Tyto údaje jsou v mezích udávaných Craigem a Woodsonem, 1959 (1), kteří popsali 22 lidských intoxikací nervovými plyny, tj. OF. Jak je vidět, srovnáme-li údaje toxicit těchto OF z náhodných otrav a z našich pokusů, docházíme k dobré shodě.

Z uvedeného vyplývá, že způsob výpočtu toxicity OF pro člověka popsanou metodou má své opodstatnění a umožňuje s malými experimentálními náklady odhadnout poměrně přesně toxicitu, a to bez rizika pokusů na dobrovolnících. Máme za to, že tento způsob by byl výhodný zejména při screeningu nových OF jako jedno z prvních třídících kritérií při výběru vysoce účinných látek typu OF.

Souhrn

V práci je sledován vztah mezi toxicitou různých organofosfátů a jejich schopností inhibovat butyrylcholinesterázu (BuChE) či acetylcholinesterázu (AChE). Bylo prokázáno, že toxicita látky je závislá na její inhibiční účinnosti k AChE, ne však k BuChE. Na základě srovnání toxicity izopropylmetylfluorofosfonátu (IMPF) a jeho schopnosti inhibovat AChE různých zdrojů (srdce, plíce, játra a mozek myši, krysy a morčete) bylo dokázáno, že toxi-

cita této sloučeniny je ve vztahu k schopnosti inhibovat pouze AChE mozkovou. Tento vztah mezi inhibicí mozkové AChE a toxicitou IMPF byl prokázán také pro další organofosfát — pinakolylmetyl fluorofosfonát a pro další druhy; pomocí uvedené závislosti byla ze znalosti inhibičního účinku na lidskou mozkovou AChE in vitro extrapolována toxicita obou těchto látek pro člověka.

Literatura

1. Craig, A. B., Woodson, M. A.: Observation on the effect of exposure to nerve gas. I. Clinical observations and cholinesterase depression. *Amer. J. Med. Sci.*, 238, 1959, s. 13–17.
2. Darlington, W. A., Partos, R. D., Ratts, K. W.: Correlation of cholinesterase inhibition and toxicity in insects and mammals. I. Ethylphosphonates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 18, 1971, s. 542–547.
3. Fukuto, T. R.: Relationships between the structure of organophosphorus compounds and their activity as acetylcholinesterase inhibitors. *Bull. WHO*, 44, 1971, s. 31–42.
4. Hraška, M., Tulach, J.: Příspěvek k automatizaci zpracování statistických dat v experimentální medicíně. Závěrečná výzkumná zpráva, VLVDÚ JEP, Hradec Králové, 1966.
5. Koelle, G. B.: Cholinesterases and anticholinesterase agents, *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Berlin, Göttingen, Heidelberg, Springer Verlag 1963.
6. Patočka, J., Tulach, J.: Zařízení pro studium kinetiky enzymů. Sborník věd. prací VLVDÚ JEP, Hradec Králové, 32, 1968, s. 361–369.
7. Reiff, B., Lambert, S. M., Natoff, I. L.: Inhibition of brain cholinesterase by organophosphorus compounds in rats. *Arch. internat. Pharmacodyn. Therap.*, 192, 1971, s. 48–60.
8. Perry-Robinson, J.: The problem of chemical and biological warfare. Vol. I. The rise of CB weapons. SIPRI, Almqvist and Wicksells, Stockholm and Humanities Press, New York, Uppsala 1971.
9. Bajgar, J.: Přehled sloučenin připadajících v úvahu jako možné „V“ látky. *Inf. zpravodaj VLIS* 9, 1968, s. 5–17.
10. Vilceanu, R., Szabadai, Z., Chiriac, A., Simon, Z.: Multiple structure-toxicity correlation of organic phosphorus compounds. *Studia biophys.*, 34, 1972, s. 1–6.
11. Vondráček, V., Bajgar, J., Fusek, J., Hrdina, V., Jakl, A., Matoušek, J., Ornst, F., Tulach, J., Urban R.: Vybrané kapitoly z toxikologie otravných látek a zdravotnické ochrany před jejich účinky. VLVDÚ JEP, Hradec Králové, 1972.