

615.784.1—092.22

ÚČINEK NĚKTERÝCH NERVOVĚ PARALYTICKÝCH LÁTEK PŘI PERKUTÁNNÍM ZASAŽENÍ

Kpt. MUDr. Jiří BAJGAR, CSc., plk. doc. ing. Jiří MATOUŠEK, DrSc., RNDr. Jiří PATOČKA

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

Perkutánní (p. c.) brána vstupu je při použití bojových chemických látek jednou z nejdůležitějších cest proniknutí otravné látky (OL) do organismu (14). Průnik OL je při tomto druhu intoxikace ovlivňován mnoha faktory, z nichž je nutno uvést alespoň stav kůže a ostatních biologických bariér, fyzikálně chemické vlastnosti dané látky včetně její

chemické stálosti, těkavosti, povrchového napětí, viskozity a j. Účinnost a průběh akutní otravy záleží vedle rychlosti průniku na charakteru biologického účinku použité OL.

Z hlediska možného vojenského použití zůstávají co do pořadí důležitosti na prvním místě látky s nervově paralytickým účinkem (NPL), jejichž mechanismus účinku je v sou-

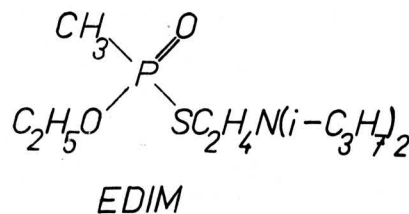
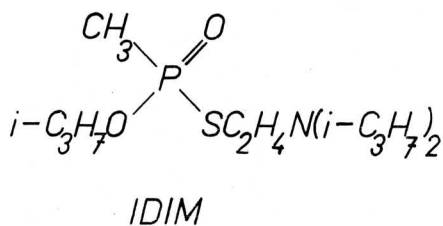
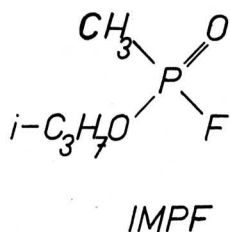


Schéma 1. Strukturní vzorce použitých nervově paralytických látek

časné době v podstatě objasněn: je vysvětlován inhibicí cholinesteráz v nervovém systému živočichů [8, 9 a jiní]. V závislosti na chemické struktuře dané NPL se však v jednotlivostech různé NPL mezi sebou značně liší, zejména při p. c. podání [17].

V této práci jsme se pokusili postihnout rozdíly v p. c. účinnosti tří NPL, které se odlišují svou chemickou strukturou. Použité NPL byly: O-isopropylmethylfluorofosfonát (IMPF), O-isopropyl-S-(2-diisopropylaminoethyl)-methylfosfonothioát (IDIM) a O-ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl)-methylfosfonothioát (EDIM). Vzorce těchto NPL jsou uvedeny na schématu 1. Jako měřítko účinku byla zvolena hodnota toxicity — LD_{50} při p. c. podání u krysy a změny aktivity funkčně rozhodujícího enzymu acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) v transportním systému — v krvi — a v místě toxického zásahu — v mozku.

MATERIÁL A METODIKA

Stanovení p. c. toxicity

Ke stanovení hodnot LD_{50} u zkoumaných látek (IMPF, IDIM, EDIM) byly použity krysy samice (Velaz), váhy 150–230 g. Bylo použito skupin po 6 zvířatech. Látky byly podávány na oholenou kůži dorzální části těla krysy kalibrovanou platinovou kličkou. Mortalita byla odečítána za 2 hod. po podání látky.

Změny aktivity AChE v průběhu p. c. otravy

Krysy samice (Velaz), váhy 150–230 g, byly rozděleny nahodilým výběrem do skupin po 5 zvířatech. Zvířatům v kontrolní skupině byl podán na oholenou kůži hřbetu fyziologický roztok, zvířatům v pokusných skupinách byly p. c. podány NPL v dávkách asi 2–4 $\times$ LD_{50} , tj.: IMPF — 156,7 mg/kg, IDIM — 0,119 mg/kg a EDIM — 0,049 mg/kg. Pak byla zvířata ve skupinách zabíjena v různých časových intervalech po intoxikaci přestřihnutím krčních cév, tj. u otravy IMPF 1, 5, 9 a 13 min. po intoxikaci, u EDIM 1, 3, 5, 10, 30 a 60 min. a u IDIM 3, 5, 10, 15, 30 a 70 min. po intoxikaci. Poslední časový interval představoval prakticky dobu uhynutí zvířat ve skupině.

Zpracování materiálu

Krev byla odebírána do zkumavek vysypných heparinem a pak hemolyzována ledovou destilovanou vodou 1 : 20; mozky byly po vyjmutí opláchnuty ledovým fyziologickým roztokem a zmrazeny na suchém ledu. Pak z nich byla vypreparována oblast prodloužené míchy a homogenizována v 0,2 M TRIS-HCl pufru pH 8,0 na 1% homogenát (homogenizátor Janke a Kunkel, NSR).

Měření aktivity AChE

Aktivita AChE byla měřena metodou podle Ellmana et al. [5], modifikovanou pro auto-

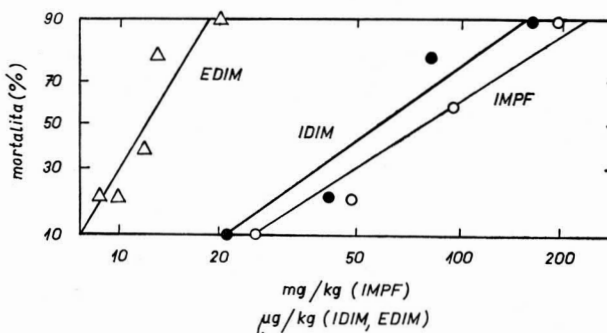
matický kolorimetr Auto Analyzer, Technicon, New York, USA [3] se substrátem acetylthiocholinjodidem (Lachema Brno) a chromogenem 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoovou kyselinou (Serva Heidelberg, NSR). Aktivita byla vyjadřována v μ mol hydrolyzovaného substrátu/min. na 100 mg vlhké tkáně nebo v 1 ml hemolyzátu, ev. jako % kontrol.

Statistické vyhodnocení

Hodnoty LD_{50} byly vypočteny probitovou metodou na počítači MINSK 22 [7]. Hodnota LT udává průměrnou dobu uhynutí. Z hodnot aktivity AChE v krvi a prodloužené míše byly vypočteny průměry s intervaly spolehlivosti ($P=95\%$) a vyjádřeny jako % kontrolních hodnot. Statistická významnost byla testována Duncanovým pořadovým testem opět na počítači MINSK 22 [7].

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky stanovení p. c. toxicity ukazuje obr. 1. Je vidět, že p. c. LD_{50} pro IMPF je asi o tři řády vyšší než velikosti LD_{50} zbývajících NPL; přitom nejvyšší toxicitu vykazuje EDIM. Sklony přímek závislostí mortalita vs. dávka



Obr. 1. Stanovení p. c. toxicity pro IMPF, IDIM a EDIM. Každý bod reprezentuje mortalitu v % u 6 zvířat

v probit-logaritmické transformaci ukazují, že pro nejvíce účinnou sloučeninu (EDIM) existuje i nejvíce strmá závislost těchto dvou veličin. Z těchto pokusů určené toxicitní konstanty jsou uvedeny v tabulce 1.

Po p. c. intoxikaci všemi použitými NPL byl pozorován intenzivní pokles aktivity AChE v krvi. Lišil se však časový průběh tohoto procesu (tedy vlastně inhibice AChE), tak i časový průběh vlastní intoxikace v závislosti na typu použité NPL.

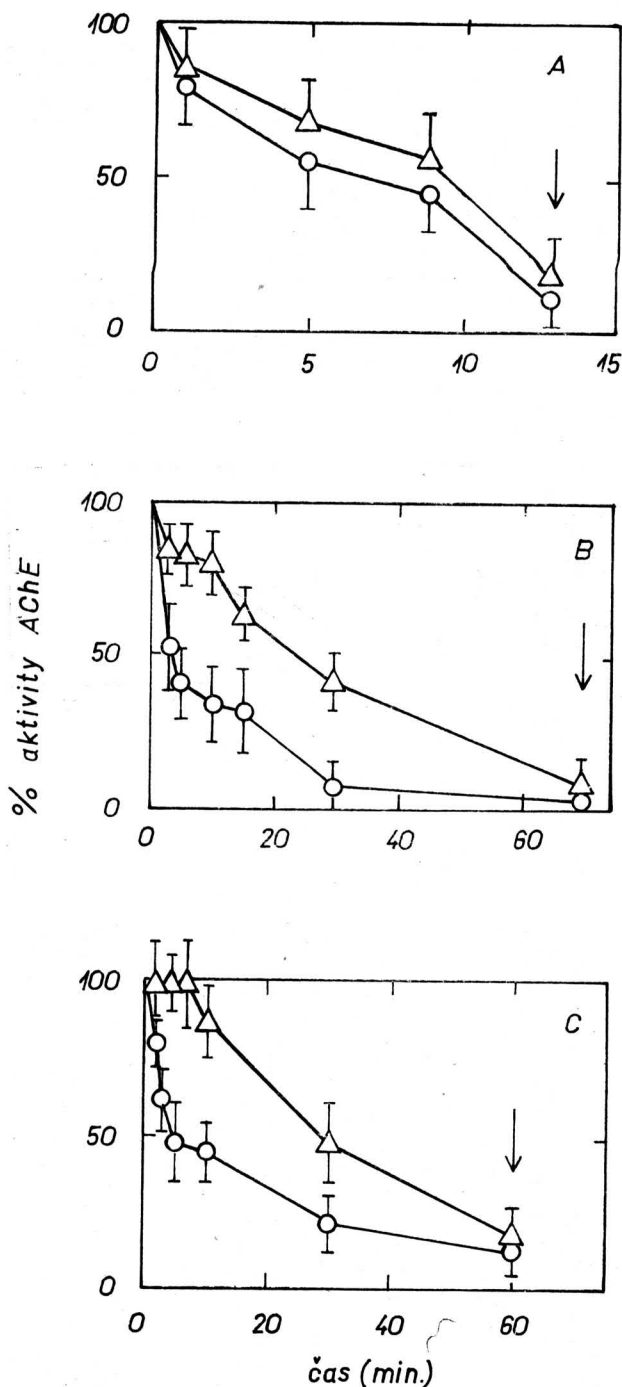
Při intoxikaci IMPF byl průběh intoxikace velmi rychlý (uhynutí všech zvířat ve skupině do 10–15 min.) a inhibice AChE v krvi tomuto rychlému poklesu odpovídala (obr. 2). Pro obě zbývající NPL byl průběh otravy prodloužen a uhynutí zvířat bylo pozorováno asi za hodinu po zasažení. Inhibice krevní AChE byla povlnnější a nejintenzivnější pokles byl pozorován až v terminálním stadiu otravy (obr. 2).

Tabulka 1

Konstanty charakterizující toxicitu tří použitých NPL při p. c. podání

Látka	LD ₅₀ (mg/kg)	LT (min.)
IMPF	79,8 (45,3 – 138,8)	16,3 (12,5 – 21,2)
IDIM	0,059 (0,039 – 0,087)	90,3 (75,9 – 107,3)
EDIM	0,0121 (0,0094 – 0,0163)	142,8 (104,5 – 194, 9)

Hodnotu v závorkách udávají intervaly spolehlivosti (P=95%)



Obr. 2. Změny aktivity AChE v krvi (○) a v pontomedulární oblasti (△) kryšního mozku při p. c. otravě IMPF (A), IDIM (B) a EDIM (C). Každý bod reprezentuje průměr z 6 měření s intervaly spolehlivosti (P=95 %)

Pokles aktivity AChE v krvi je však pouze odrazem stavu transportního systému, kterým je noxa dopravována na místo vlastního toxického účinku. Tento vlastní efekt je vyjádřen sledováním inhibice AChE v mozku, resp. v jeho části důležité pro dechové funkce (16) — v prodloužené míše. Je vidět, že u otravy IMPF je inhibice AChE v pontomedulární oblasti prakticky stejně rychlá jako v krvi. U dalších dvou NPL byla inhibice AChE v mozku proti krvi opožděna, pro EDIM byla zřetelná i jakási doba latence (obr. 2). V dalším průběhu otravy se však inhibice prudce zvyšovala a v terminálním stadiu otravy opět dosahovala maxima.

Z výsledků je zřejmý význam látek typu EDIM a IDIM — organofosforových sloučenin typu V. Jejich p. c. toxicity jsou proti IMPF (reprezentant klasických NPL) zhruba 1000-krát vyšší. Tento fakt je způsoben zřejmě větší chemickou stálostí EDIM a IDIM proti IMPF a zřejmě i rychlostmi detoxikace, které jsou pro IMPF relativně rychlé (6), zatímco pro EDIM a IDIM prakticky neprokazatelné (12).

Zajímavým nálezem u EDIM je jistá doba latence před inhibicí AChE v mozku. Tato latence byla pozorována i při p. c. intoxikaci psů, kde však byla vyjádřena daleko zřetelněji (4). Vzhledem k rychlejšímu metabolismu u krysy než u psa je kratší doba latence zcela pochopitelná.

Srovnáním inhibice AChE v krvi a prodloužené míše je možno dojít k názoru, že inhibice mozkové AChE s menším zpožděním odráží stav aktivity AChE v krvi. Toto zjištění je velmi významné pro diagnostiku otrav NPL, protože krev je snadno dostupným materiálem pro klinicko-laboratorní vyšetření. Z uvedeného srovnání také vyplývá, že existuje rychlá penetrace uvedených NPL do mozku, protože inhibice AChE ireverzibilními inhibitory, kterými použité látky jsou (2, 13), je vlastně obrazem rychlosti jejich penetrace do kompartmentu, kde je aktivita AChE měřena (10, 11). Vysoká inhibice AChE v prodloužené míše dále svědčí pro centrální působení uvedených NPL v CNS i při p. c. podání. Centrální efekt IMPF při i. m. podání byl prokázán dříve (2). Pokud se týká EDIM, Sidell et al. (15) popsali centrální účinek této NPL na zdravých dobrovolnících. Zjistili, že látka má centrální účinek při i. v. podání, ne však při perorální aplikaci. Vzhledem k tomu, že při p. c. podání (jak

tomu bylo v našich pokusech) byl centrální efekt (vyjádřený jako inhibice AChE) pozorován také, je možno uvažovat o tom, že tento druh podání (p. c.) se i přes nutnost penetrovat přes více biologických bariér než při i. v. podání (podobně jako při perorálním podání) spíše blíží podání i. v. než perorálnímu.

Vzhledem k tomu, že v minulých pokusech bylo prokázáno, že AChE pontomedulární oblasti mozku vykazuje in vivo nejvyšší afinitu k IMPF, IDIM a analogickým NPL (1, 2), je možno uvažovat o této struktuře jako funkčně velmi důležité pro centrální efekt uvedených NPL, a to i při p. c. intoxikaci.

Závěrem je možno konstatovat, že všechny tři NPL představují vzhledem ke své vysoké toxicitě velmi reálné nebezpečí při jejich použití v případném válečném konfliktu. IDIM a EDIM jsou látky vysoce účinné, převyšující IMPF, zvláště p. c. toxicitou. V přepočtu na molární koncentrace účinkují při p. c. podání smrtelně již v dávkách 10^{-7} molu/kg a tím se řadí k nejtoxičtějším nízkomolekulárním sloučeninám současné doby.

Souhrn

U krys byla stanovena p. c. toxicita tří nervově paralytických látek, O-isopropylmethylfluorofosfonátu (LD_{50} , p. c. = 79,8 mg/kg),

O-ethyl-S-[2-diisopropylaminoethyl]-methylfosfonothioátu (LD_{50} , p. c. = 0,012 mg/kg) a

O-isopropyl-S-[2-diisopropylaminoethyl]-methylfosfonothioátu (LD_{50} , p. c. = 0,059 mg/kg). Dále byl sledován časový průběh změn aktivity acetylcholinesterázy (AChE) v krvi a pontomedulární oblasti mozku krys otrávených p. c. třemi uvedenými látkami v dávkách cca $2-4 \times LD_{50}$. Inhibice AChE v transportním systému — v krvi — je při otravě první látkou značně rychlá a prakticky shodná s rychlostí inhibice AChE v mozku. U ostatních dvou látek byl pozorován protražovanější průběh intoxikace i pomalejší inhibice AChE v krvi. Pokles aktivity AChE v pontomedulární oblasti mozku byl proti krvi opožděn také.

Poděkování

Autoři děkují s. M. Gregorové, E. Vodákové a E. Seidlové za technickou spolupráci.

Literatura

1. Bajgar, J.: Time course of acetylcholinesterase inhibition in the medulla oblongata of the rat by O-ethyl-S-[2-dimethylaminoethyl]-methylphosphonothioate in vivo. *Brit. J. Pharmacol.*, 45, 1972, 368 až 371.
2. Bajgar, J.: Inhibition of acetylcholinesterase in different parts of the rat brain by isopropyl methylphosphonofluoridate; in vitro and in vivo experiments. *Biochem. Pharmacol.*, 21, 1972, s. 687—694.
3. Bajgar, J. - Patočka, J. - Jakl, A.: The influence of O-isopropyl S-[2-diisopropylaminoethyl] methylphosphonothioate on tissue cholinesterases of the guinea-pig. *Suppl. Sborníku věd. prací LF KU v Hradci Králové*, 16, 1973, s. 225—232.
4. Bajgar, J. - Patočka, J. - Matoušek, J.: Změny aktivity acetylcholinesterázy při experimentální intoxikaci O-ethyl-S-[2-diisopropylaminoethyl] methylfosfonothiolátem. *Voj. zdrav. Listy*, 1975, v tisku.
5. Ellman, G. L. - Courtney, D. K. - Andres, V. - Featherstone, R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 1961, s. 88—95.
6. Fest, C., Schmidt, K. J.: The chemistry of organophosphorus pesticides. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag 1973.
7. Hraška, M. - Tulach, J.: Příspěvek k automatizaci zpracování statistických dat v experimentální medicíně. *VLVDÚ JEP, Hradec Králové*, 1966.
8. Koelle, G. B.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Cholinesterases and anticholinesterase agents. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag 1963.
9. Namba, T.: Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects. *Bull. WHO*, 44, 1971, s. 289—307.
10. Novgorodskaja, A. M. - Rozengart, V. I. - Ščerbak, I. G.: Distribution of the organic phosphorus containing compound cholinesterase inhibitor (LG-63) at various routes of administration. *Vopr. med. chimii*, 14, 1968, s. 288—294.
11. Novgorodskaja, A. M. - Rozengart, V. I. - Ščerbak, I. G.: Anticholinesterase action of organophosphorus compound LG-63 in vivo. *Biochimija*, 36, 1971, s. 72—80.
12. Ornst, F.: Ústní sdělení, 1974.
13. Patočka, J. - Bajgar, J.: Rychlost stárnutí acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy inhibované O-isopropyl S-[2-diisopropylaminoethyl] methylthiofosfonátem. *Českoslov. farm.*, 23, 1974, s. 25—27.
14. Robinson, J. P.: The problem of chemical and biological warfare. Vol. II. CB weapons today. Stockholm, SIPRI, Almquist & Wiksell 1973.
15. Sidell, F. R. - Aghajanian, G. K. - Groff, W. A.: The reversal of anticholinergic intoxication in man with the cholinesterase inhibitor VX. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 144, 1974, s. 725—730.
16. Tabatabai, M.: Respiratory and cardiovascular responses resulting from heating the medulla oblongata in cats. *Amer. J. Physiol.*, 222, 1972, s. 1558—1564.
17. 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.