

ROLE CHOLINERGNIÍCH A NECHOLINERGNIÍCH MECHANISMŮ PŘI TOXICKÉM ÚČINKU NERVOVĚ PARALYTICKÝCH LÁTEK

Pplk. doc. MUDr. Jiří BAJGAR, CSc.

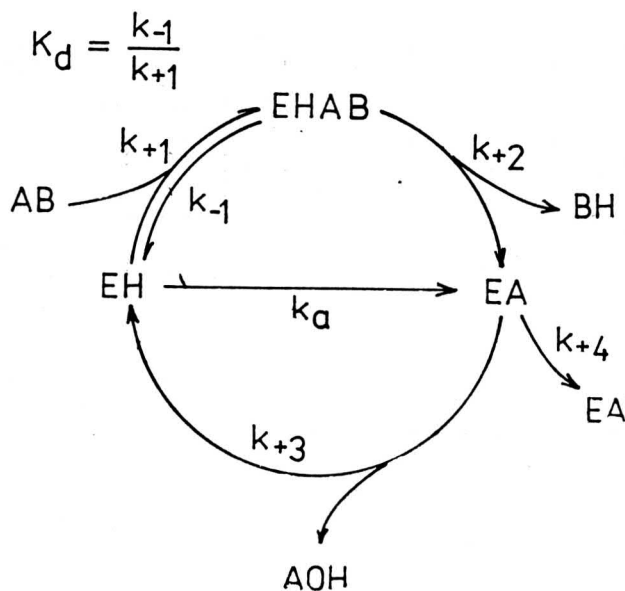
Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP, Hradec Králové
(náčelník: genmjr. prof. MUDr. J. Vaňásek, CSc.)

Organické sloučeniny fosforu vykazují rozmanité biologické účinky. Mohou to být účinky dráždivé (deriváty fosfinu), mutagenní, teratogenní či karcinogenní (cyklofosamid, parathion), nefrotoxické (dimethylfosfát), myelo- a pneumotoxické (hexamethylfosforamid). Některé z nich působí na CNS tlumivě, či naopak způsobují poruchy psychických funkcí (triethylfosfát — psylocybin) nebo mají neurotoxický efekt (TOCP). Organické sloučeniny fosforu se účastní energetického metabolismu (ATP, fosforylované cukry) a ovlivňují účinek hormonů či mediátorů (cyklické nukleotidy). V této skupině látek tedy můžeme na jedné straně nalézt sloučeniny pro život nezbytné a naopak na druhé straně do ní patří vysoce toxické látky, které život ohrožují již v minimálních dávkách.

Z hlediska praktického použití i biologického účinku jsou nejvýznamnější skupinou organofosforové inhibitory cholinesteráz, pro které se vžil název organofosfáty (OF). Tyto látky jsou používány v průmyslu, medicíně humánní či veterinární a v zemědělství. Jsou to však i látky použitelné ve válečném konfliktu jako bojové chemické látky, kde by tvořily nejdůležitější skupinu aktuálních otravných látek — nervově paralytické látky (NPL). K nejznámějším představitelům NPL patří sarin, soman a VX látka. Jejich efekt je charakterizován zásahem do cholinergního přenosu nervového vzruchu a za hlavní mechanismus účinku je považována inhibice cholinesteráz. Výzkumu jejich účinku je ve světě věnována soustavná pozornost, jak o tom svědčí celá řada učebnic, souborných prací i kongresů z poslední doby.

OF tedy působí inhibicí acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7), butyrylcholinesterázy (BuChE, EC 3.1.1.8) a dalších hydroláz. Na synapsích, kde je vzruch přenášen acetylcholinem, dojde v důsledku inhibice AChE k jeho nahromadění a tedy v podstatě k endogenní intoxikaci acetylcholinem.

Interakci OF s AChE je možno vyjádřit jednoduchým schématem (obr. 1), kde EH je enzym (AChE), AB je OF, přičemž B je jeho odstupující skupina; EHAB je přechodný komplex enzym-inhibitor, k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} , k_{+3} , k_{+4} a k_a příslušné rychlostní konstanty a K_d disociační konstanta. Znovuobnovení aktivity AChE — reakce (na obr. 2 znázorněno jako přeměna EA → EH) — probíhá spontánně velmi malou rychlostí. Reaktivaci je možno urychlit jak in vivo, tak in vitro přidáním některých nukleo-



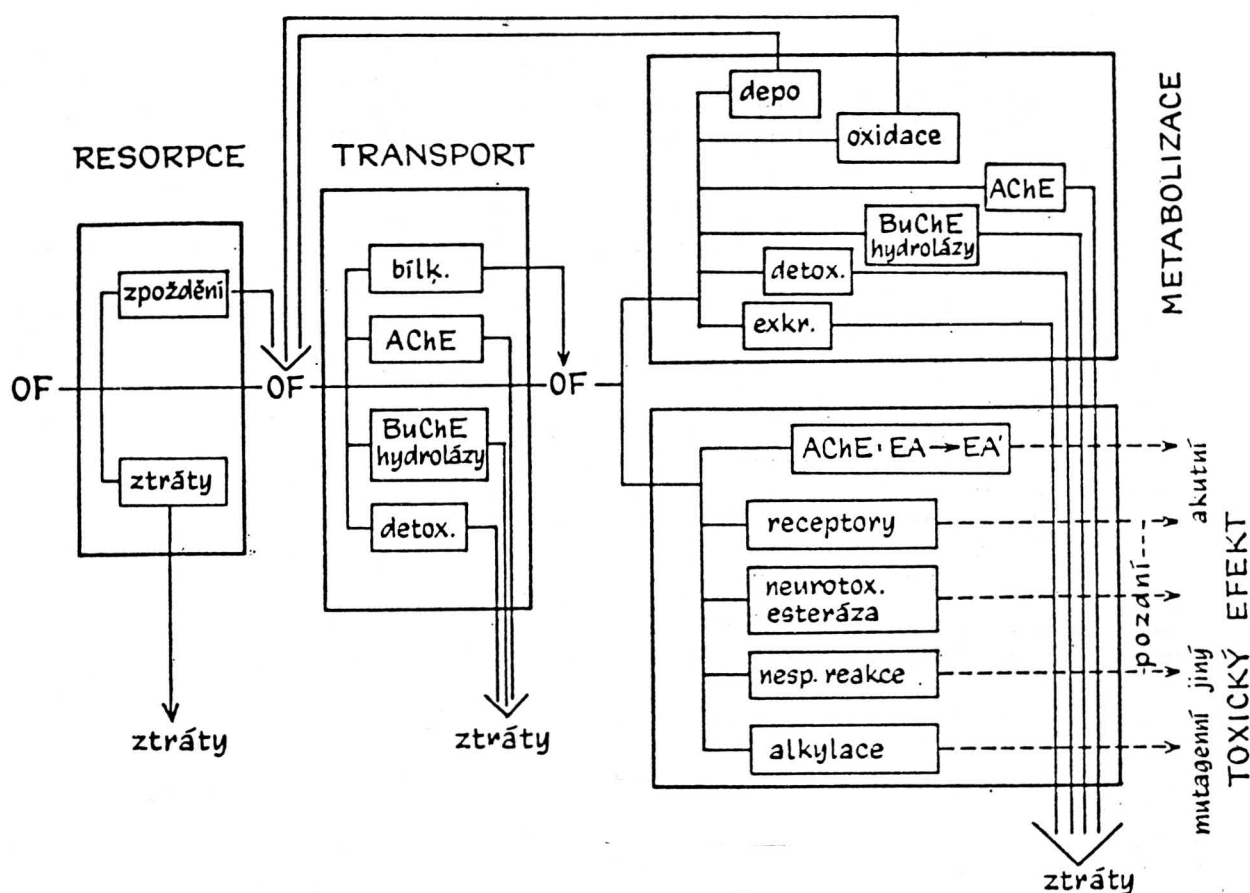
Obr. 1. Reakce organofosforových inhibitorů s acetylcholinesterázou. Bližší vysvětlení v textu.

filních činidel, např. oximů (reaktivátorů cholinesteráz), které znovuobnoví (reaktivují) aktivitu inhibované AChE. U některých OF však probíhá děj, zvaný dealkylace (často ageing), tj. přeměna komplexu EA → EA'. Dealkylovaný enzym (EA') není přístupný účinku reaktivátorů — je v tzv. nereaktivovatelné formě. Nejrychleji dealkyluje AChE inhibovaná somanem (poločas dealkylace je řádově udáván v minutách), pomaleji AChE inhibovaná sarinem (poločas dealkylace je kolem 10 h). U AChE inhibované látkou VX nebyla dealkylace prokázána ani po 24 h.

Při působení na organismus však hrají roli i další děje, které je možné vyjádřit následujícím schématem (obr. 2).

Celé schéma představuje organismus, kde probíhají čtyři hlavní fáze účinku OF — resorpce, transport, metabolizace a vlastní toxický efekt. Při tomto ději nastávají ztráty, které jen potvrzují vysokou toxicitu OF. Vlastní toxický efekt je totiž realizován jen zlomkem podané dávky OF; zbytek představuje ztráty, vznikající nejrůznějšími způsoby. Ztráty OF mohou dosáhnout podle druhu OF 50 až 99 %.

Při expozici OF je kromě případu i. v. podání pozorováno zpoždění, které je dáno průnikem OF přes biologické bariéry. Ztráty v této fázi jsou spíše fyzikálně chemického charakteru; průnik OF do oběhu je tímto dějem zpomalen.



Obr. 2. Čtyři hlavní fáze při účinku organofosfátů. Bližší vysvětlení v textu.

V transportním systému — krevním oběhu — reaguje OF s cholinesterázami a dalšími hydrolázami v krvi; některé OF se vážou na bílkoviny plazmy a některé mohou být již v krvi částečně detoxikovány.

Transportním systémem je OF zanesen na místo metabolizace a toxického efektu. Metabolizace zahrnuje detoxikační reakce zejména v játrech, exkreci a interakci s enzymy; OF, který je takto navázán, je opět z dalšího účinku vyloučen. V této fázi se může projevit i alkylační efekt některých OF.

Metabolizace však zahrnuje i oxidační reakce, které vedou ke vzniku toxičtější sloučeniny, která je vyplavena zpět do oběhu. OF (zejména lipofilní) se však může i ukládat v tukové tkáni, odkud bývá opět vyplaven do oběhu a působí další vlnu intoxikace. V místě toxického efektu (centrální a periferní nervový systém a některé efekторы) OF inhibuje AChE, která nadále již nemůže štěpit ACh a projeví se důsledky jeho zvýšené koncentrace. OF může přímo reagovat i s receptory, což vede k zcitlivění receptorů na mediátor a tím ke zintenzivnění akutních i pozdních příznaků. Interakcí s esterázami a jejich následnou dealkylací dochází k pozdnímu neurotoxickému účinku. Také v místě toxického efektu může docházet k detoxikaci, která je zde však minimální.

Na základě tohoto schématu je možno vytýpat některé otázky týkající se mechanismu

intoxikace OF — a tedy ve svém důsledku i její léčby, která může být efektivní právě jen tehdy, bude-li znám detailní účinek toxické látky.

V první fázi zasluhuje naši pozornost rychlost průniku OF při různých branách vstupu — srovnatelná u sarinu a somanu, která je několikanásobně (v závislosti na druhu podání) rychlejší než u látky VX. Naopak ztráty, které vznikají při průniku přes kůži, jsou nejmenší u VX, čímž je možné vysvětlit i její nejvyšší toxicitu (tabulka 1).

Tab. 1

Toxicity některých NPL při p.c. podání

Látka	p.c. LD ₅₀ v mg/kg		
	krysa	morče	králík
Sarin	130,41 ± 87,56	98,49	11,85
Soman	16,42 ± 5,32	22,73 ± 4,98	5,868
Reprezentant V-látek	0,0632 ± 0,0218	0,6310 ± 0,3509	0,0572
VX	0,0148 ± 0,0083	0,246	0,0567 ± 0,0246

V transportním systému je OF vázán na bílkoviny, odkud se může uvolňovat a tak být

v podstatě rezervoárem volného OF. Vazba na bílkovinu byla prokázána zejména u sarinu a DFP. Vazba OF na AChE erytrocytů, BuChE plazmy a ostatní hydrolázy vede pouze ke snížení koncentrace OF, čímž dochází k jeho vyloučení z dalšího toxického efektu. Inhibice cholinesteráz v krvi má velmi důležitý diagnostický význam, protože jejich snížení odráží velmi dobře stav organismu intoxikovaného OF. Detoxikační systémy v krvi mohou hrát důležitou roli při ovlivnění toxicity sarinu a somanu, které jsou detoxikovány na rozdíl od látky VX, která detoxikována není.

Dávka OF, která je vstřebávána do oběhu při různých branách vstupu, se pak liší; dá se říci, že při i. v. podání je v krevním oběhu 100 % podané dávky; při i. m. podání je to kolem 55–85 %, při i. p. asi 40 % a při p. o. jen kolem 10 % z podané dávky.

Fáze metabolisme zahrnuje děje, které vedou ke zvýšení toxicity buď metabolismem (oxidací) OF na toxičtější produkt (tzv. letální syntéza) — např. u malathionu oxidace na malaoxon nebo parathionu na paraoxon; zvýšení toxicity je dáno uvolňováním OF z vazby na bílkovinu či jeho vyplavováním z tukového depot (zejména lipofilní látky). V poslední době se objevují práce, svědčící i pro svalové depot somanu.

Účinek na enzymy (AChE, BuChE, hydrolázy) má za následek snížení koncentrace OF schopného působit toxický efekt — obdobně jako je tomu v krvi. Podobný efekt — snížení koncentrace OF — má i detoxikace (prokázaná pro sarin a soman, ne však pro VX látku) v játrech a exkrece, která však byla sledována jen pro DFP u lidí: 60–70 % metabolitů DFP bylo vyloučeno během 10 dní.

Posledním a nejdůležitějším dějem je vlastní toxické působení OF. Zahrnuje interakci s AChE, ať již v periferním, či centrálním nervovém systému, a v závislosti na typu látky i proces dealkylace. Také zde není možné simplifikovaně usuzovat na účinek OF z pokusů na jednom druhu laboratorního zvířete. Obecně je možno říci, že soman proniká dobře do mozku i do periferního nervového systému; sarin v podstatě také, i když v mozku již působí selektivně, ať již na strukturální, subcelulární či molekulární úrovni; VX látka proniká lépe do periferního nervového systému a v mozku působí selektivní inhibici jen některých struktur. Za zmínku stojí údaje o množství OF z podané dávky, interagující s AChE nervového systému. Bylo zjišťováno radioizotopovými technikami či nepřímo pomocí inhibice AChE. V literatuře se udává asi 4 % z podané dávky pro soman, 1 % pro sarin a méně než 1 % pro VX.

Kromě inhibičního efektu na cholinesterázy má však OF účinky další. Otázkou zůstává, do jaké míry jsou tyto efekty přímým účinkem OF a do jaké míry jsou zprostředkované, tj. způsobené ovlivněním cholinergního přenosu nervového vzruchu nebo jsou výsledkem rozvrá-

ceného metabolismu v důsledku porušených fyziologických funkcí.

Přímý účinek OF je možný na úrovni receptorů, což bylo prokázáno pro soman u dešťovky (*Eisenia foedida*). Další účinek na receptory představuje jejich sensibilizace v důsledku inhibice AChE. U OF insekticida Neguvonu byl prokázán jeho přímý pre- i postsynaptický efekt, který nebyl spojen s inhibicí AChE. Zprostředkovaný účinek, způsobený ovlivněním cholinergního přenosu nervového vzruchu, má základ spočívající v úzkém spojení cholinergního přenosu s ostatními mediátorovými systémy. Ovlivnění cholinergního přenosu pak modifikuje i necholinergní odpověď a naopak. Toto spojení bylo prokázáno pro acetylcholin a katecholaminy, GABA, peptidy, cyklické nukleotidy a prostaglandiny.

Práce z této oblasti se dají rozdělit na studie, které se zabývají vztahem cholinergních neuronů k jiným mediátorovým systémům, dále práce, které studují vztahy klíčového enzymu u intoxikace OF — tj. AChE — k jiným systémům, a práce, které přímo dokazují změny necholinergní povahy po účinku OF.

Byla prokázána alterace cholinergních receptorů po chronickém podávání OF a karbamátů. Touto vlastností je také vysvětlována tolerance inhibitorů cholinesteráz u savců.

Regulace aktivity AChE a BuChE je složitější, než se dříve předpokládalo. Hrají v ní roli dědičné vlivy a hormonální regulace — např. inzulin může indukovat zvýšenou hladinu AChE. Vztah AChE a cyklických nukleotidů byl demonstrován také. Byl prokázán stimulační vliv c-AMP na AChE v mozkových řezech a v mikrozomech mozkové tkáně u krysy. Více autorů prokázalo, že u intoxikace OF (sarin, VX, Fosdrin, soman) je zvýšena hladina c-AMP či c-GMP a že některé OF inhibují aktivitu fosfodiesterázy, která štěpí c-AMP či c-GMP.

Chronická inhibice AChE způsobená opakovaným podáváním DFP zapříčinila vzrůst počtu dopaminergních a GABA-ergních receptorů v krysím mozku. Na základě těchto pozorování byly provedeny i celkem úspěšné pokusy s profylaktickým efektem α -2-adrenergního agonisty Clonidinu proti účinkům krátkodobých inhibitorů AChE. OF dále inhibují ATP-ázu a reaktivátory cholinesteráz ovlivňují jak aktivity ATP-ázy, tak adenylcyklázy.

OF zasahují i do metabolismu neuromediatorových peptidů; jednak je AChE inhibována β -endorfinem, jednak je např. substance P hydrolyzována plazmovou BuChE. Lokální podání leu⁵-enkefalinu do oblasti septa u kryse ovlivnilo statisticky významně aktivitu AChE i cholinacetyltransferázy v dalších strukturách. Existují důkazy o tom, že indomethacin a aspirin působí zvýšení aktivity AChE, což svědčí pro spojení cholinergního systému s prostaglandiny. Aktivita AChE a ATP-ázy je indukována i acetylcholinem, pravděpodobně mechanismem zpětné vazby. Změny hladiny katechola-

minů v mozku při intoxikaci OF byly prokázány již dříve na našem pracovišti a tyto výsledky byly potvrzeny i pro jiné OF. Bylo také prokázáno snížení aktivity mozkové monoaminoxidázy po podání Neguvonu.

Práce, které sledují jiné účinky OF — avšak ne ve vztahu k neuromediátorovým mechanismům — existují také. Už déle je známo, že expozice OF (ať již experimentální u zvířat, tak u intoxikací humánních) je doprovázena kromě inhibice AChE také zvýšením aktivity transamináz a leukocytózou. Při intoxikaci OF bylo pozorováno i ovlivnění alkalické a kyselé fosfatázy, γ -glutamyltransferázy, diacylglycerolkinázy a fosfatidylinositol fosfodiesterázy. Experimentálně bylo dokázáno uvolňování β -glukuronidázy z krysích hepatocytů účinkem OF in vitro, které nebylo vázáno na snížení aktivity AChE. Některé OF zasahují do metabolismu bílkovin a RNA. Zásahem do metabolismu RNA je možno vysvětlit mutagenní efekt prokazovaný u některých OF.

U intoxikace OF se mění též energetický metabolismus — zvyšuje se koncentrace glukózy, laktátu a pyruvátu. Bylo prokázáno i ovlivnění sukcinátdehydrogenázy účinkem OF in vitro a in vivo a zvýšení hladiny ATP a ATPázy při intoxikaci OF. OF ovlivňují i syntézu porfyrinů v játrech — zvýšení bylo pozorováno po podání parathionu a malathionu. Jsou schopny ovlivnit i imunobiologickou schopnost organismu — snížená produkce IgG a snížení buněčné imunitní odpovědi.

Po podání některých OF (parathion) byl vý-

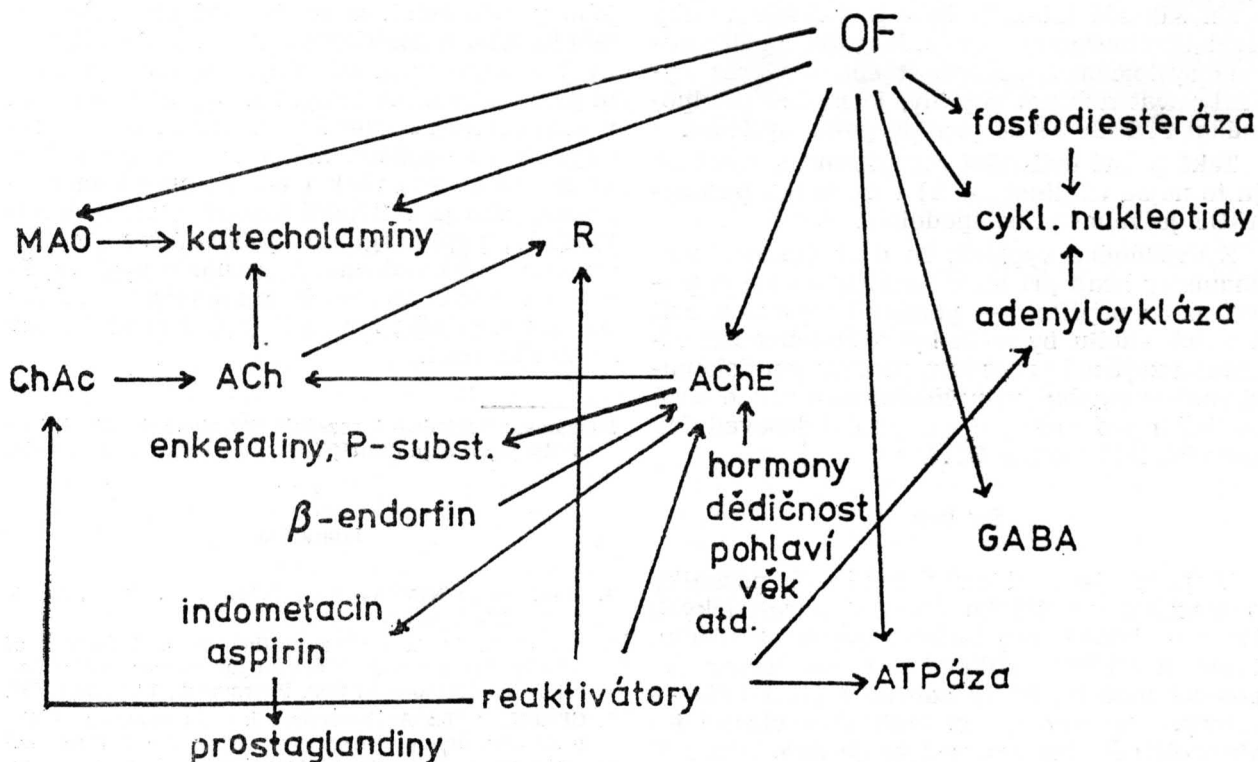
razně porušen vodní a minerální metabolismus, přičemž natriuretický efekt nebyl spojen s inhibicí AChE v erytrocytech či ledvinné tkáni. Intoxikace OF také představuje výrazný stresogenní faktor. V pokusech na krysách byl prokázán vzestup sérového kortikosteronu a následná aktivace tyrosin aminotransferázy po podání sarinu, látky VX a Dicrotofosu. Glukokortikoidy působí příznivě na pozdní neurotoxicitu způsobenou OF. OF zasahují i do syntézy fosfolipidů. V pokusech in vitro OF alterovaly zabudování fosfolipidů na arteficiální membránu. Schematické znázornění uvedených souvislostí je znázorněno na obr. 3 a 4.

Pokud tyto výsledky shrneme, můžeme dojít k názoru, že bezpečně prokázaný se jeví účinek OF na metabolismus jaterní buňky, a to v závislosti na druhu a dávce použitého OF.

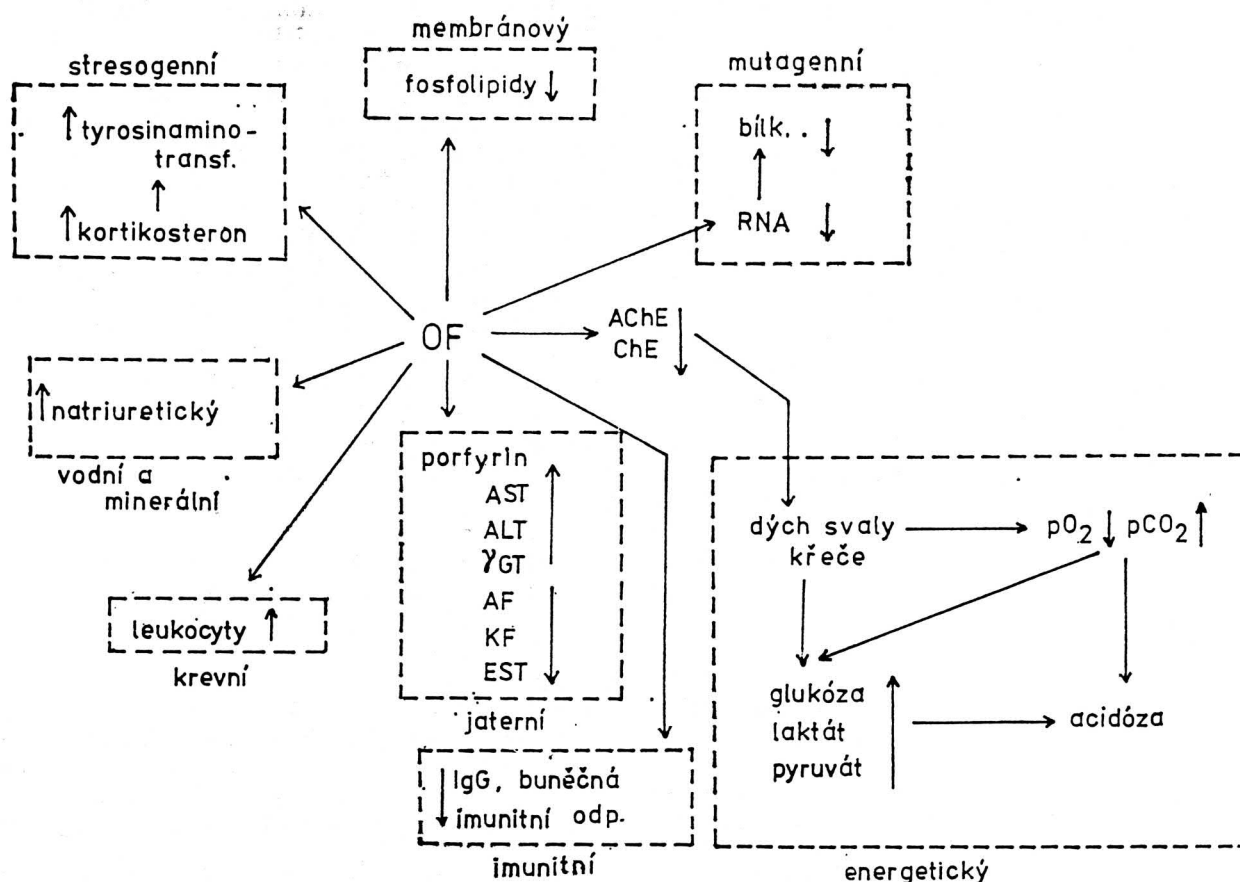
Dalším faktorem, který je možno považovat za prokázaný, je zvýšení hladin cyklických nukleotidů po účinku OF in vivo, což pravděpodobně souvisí se zvýšenou křečovou aktivitou.

Změny v hladinách katecholaminů nejsou tak průkazné — někteří autoři udávají vysoké ovlivnění, jiní je naopak popírají. Přikláníme se k názoru, že tyto změny existují, avšak budou způsobeny spíše zprostředkovaným mechanismem přes účinek cyklických nukleotidů nebo interakcí adrenergního a cholinergního nervového systému.

Dalším prokázaným faktorem je stresogenní efekt OF. Je celkem pochopitelný vzhledem k tomu, že se jedná o relativně razantní zásah do metabolismu celého organismu.



Obr. 3. Schematické znázornění interakcí organofosfátů (OF) s různými necholinergními systémy přenosu nervového vzruchu. R — acetylcholinový receptor; ACh — acetylcholin; ChAc — cholinacetyltransferáza; MAO — monoaminoxidáza; GABA — γ -aminomáselná kyselina



Obr. 4. Schematické znázornění některých účinků organofosfátů (OF) bezprostředně nesouvisících s přenosem nervového vzruchu. AChE, ChE — acetyl a butyrylcholinesterázy; AST, ALT — transaminázy; AF, KF — alkalická a kyselá fosfatáza; γ -GT — γ -glutamyltransferáza; EST — esterázy; RNA — ribonukleová kyselina

Na základě toho, že byly prokázány vztahy mezi cholinergním a peptidergním mediátory, v systému a schopnost cholinesteráz hydrolyzovat některé peptidy, je možné předpokládat i zásah OF do peptidergního systému.

Také přímé ovlivnění receptorových systémů (a to nejen cholinergních) v důsledku působení OF je velmi pravděpodobné.

Z uvedeného vyplývá, že necholinergní mechanismy hrají při intoxikaci OF — ať již přímo, nebo nepřímo — poměrně závažnou roli a jejich studiu by měla být v budoucnu věnována zvýšená pozornost, protože jen dokonalá znalost mechanismu účinku nám ukáže nové možnosti pro rozšíření a doplnění dosavadních způsobů léčby otrav OF.

Souhrn

V práci jsou shrnuty současné poznatky o mechanismu účinku nervově paralytických látek a dalších organofosforových sloučenin. Intoxikace těmito látkami je charakterizována pomocí modelu, který zahrnuje čtyři děje — resorpci, transport, metabolizaci a vlastní toxický účinek. Při resorpci hraje důležitou roli rychlost penetrace látky přes biologické bariéry; v transportním systému noxa buď je (sarin, soman), nebo není (VX látka) detoxikována a

jeho prostřednictvím se dostává na místo metabolického a toxického efektu. Metabolizovány jsou zejména sloučeniny, používané v civilní praxi jako insekticidy. Toxický efekt spočívá v inhibici cholinesteráz na cholinergních synapsích s následnou akumulací acetylcholinu. Uplatňují se zde však i necholinergní mechanismy, jako je ovlivnění hladin cyklických nukleolidů, peptidergního systému, receptorů a jaterního metabolismu. Z přehledu vyplývá, že znalost necholinergních mechanismů účinku by mohla přinést nové přístupy k terapii otrav těmito látkami.

Poznámka: Vzhledem k rozsáhlé literatuře (94 citací) jsou uvedeny jen nejdůležitější literární prameny z poslední doby.

Literatura

1. BAJGAR, J.: Novinky v medicíně č. 34. Praha, Avicenum 1985. V tisku.
2. ELLIN, R. I.: Anomalies in theories and therapy of intoxication by potent organophosphorus anticholinesterases compounds. Gen. Pharmacol., 13, 1982, s. 457.
3. GREEN, A. L.: A theoretical kinetic analysis of the protective action exerted by eserine and other carbamate anticholinesterase against poisoning by organophosphorus compounds. Biochem. Pharmacol., 32, 1983, s. 1717.
4. HRDINA, V. aj.: Toxikologie bojových chemických lá-

- tek a zdravotnicko-protichemická ochrana. Učební texty VLVDÚ JEP. Hradec Králové, VLVDÚ JEP 1983.
5. KONGRES „Symposium on prophylaxis and treatment of organophosphate poisoning“. San Diego, 5.—6. 5. 1981.
6. KONGRES „Prophylaxis and tretatment of chemical poisoning“. San Diego, 26.—27. 8. 1983.
7. KONGRES „Second international meeting on cholinesterases. Fundamental and applied aspects“. Bled, 17.—21. 9. 1983.
8. KONGRES „International symposium on protection against chemical warfare agents“. Stockholm, 6.—9. 7. 1983.
9. MICHAJLOV, S. S. - ŠČERBAK, I. G.: Metabolizm fosfororganičeskich jadov. 1. vyd. Moskva, Medicina 1983.
- Klíčová slova: Organofosfáty; Nervově paralytické látky; Acetylcholinesteráza; Mechanismus účinku; Neuromediátory.