

616-001.9-02:615.7:615.9

STRESGENNÍ ÚČINEK 2-DIMETHYLAMINOETHYL-(DIMETHYLAMIDO) FLUORFOSFÁTU

Plk. MUDr. Jiří KASSA, CSc.

Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové
(rektor: plk. prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc.)

Úvod

Základním mechanismem účinku organických sloučenin fosforu (OF) je zásah do cholinergního přenosu nervového vzruchu cestou ireverzibilní inhibice acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) - enzymu rozkládajícího neuromediátor acetylcholin (ACh) (Bajgar, 1985).

OF však zasahují i do jiných funkčních systémů organismu především cestou narušování homeostázy vnitřního prostředí, na což organismus reaguje aktivací stresogenních mechanismů (Sourkes, 1983). Způsobují mimo jiné změny v metabolismu katecholaminů v důsledku aktivace sympatoadrenálního systému (Bajgar, 1992), změny v metabolismu glukokortikoidů v důsledku aktivace hypothalamo-hypofyzeo-adrenální osy (Kassa, 1987), ovlivňují obranyschopnost organismu (Bajgar, 1992) a narušují acidobazickou rovnováhu ve smyslu respirační a metabolické acidózy (Bajgar, 1985).

Za zvlášť výhodné biochemické ukazatele stresogenního účinku OF lze považovat glukokortikoidy a jimi aktivované enzymy. Glukokortikoidy se vlivem stresu zvýšeně vyplavují z kůry nadledvin do krve (Fenske, 1984), kde plní důležitou úlohu při regulaci periferního metabolismu cestou aktivace řady enzymů. Mezi enzymy aktivované glukokortikoidy patří i tyrozin aminotransferáza (TAT, EC 2.6.1.5) (Lin a spol., 1957). TAT je enzym katalyzující v játrech první krok metabolické přeměny L-tyrozinu, transaminaci s alfa-ketoglutarátem. Zasahuje tak do stresem indukované glukoneogeneze cestou zásobování této syntézy fumarátem, který je jedním z konečných produktů metabolismu L-tyrozinu (Németh, 1977).

Stresogenní účinek OF je v této práci zkoumán u zvlášť toxického OF inhibitoru AChE - látky GV (chemicky 2-dimethylaminoethyl-(dimethylamido) fluorofosfát) (Hrdina a spol., 1990).

Cílem této práce je zjistit míru stresogenního účinku látky GV na úrovni subletálních dávek. Dosud byl stresogenní účinek prokázán především u organofosforových insekticid (OFI) (Szot a spol., 1971; Kassa, 1987).

Materiál a metody

K pokusům byly použity samice bílého potkana kmene Wistar chovu Velaz Praha o hmotnosti 200-250 g. Pokusná zvířata byla krmena standardní Larsenovou dietou a vodou ad libitum.

Hodnota LD₅₀ látky GV (VÚ 070 Brno) byla stanovena před zahájením experimentálních prací probitovou metodou při hodnocení úmrtnosti zvířat za 2 a 24 h po podání noxy. Bylo použito 5 skupin po 6 zvířatech. GV látka byla

potkanům podávána intraperitoneálně (i. per.) v subletálních dávkách 4 a 16 µg/kg.

Experimentální skupiny zvířat byly vždy srovnávány s kontrolní skupinou, které byl i. per. podáván místo látky GV fyziologický roztok (F1/1) ve stejném objemovém množství (0,1 ml/100 g). První, třetí a dvacátou čtvrtou hodinu po podání OF či F 1/1 byla laboratorní zvířata usmrcena dekapitací, odebrána krev, mozek a játra a v těchto orgánech stanovována aktivita cholinesteráz (ChE), TAT a kortikosteronu (KS) - hlavního glukokortikoidu potkanů (Bush, 1953).

ChE byly stanovovány v plné krvi a mozku spektrofotometrickou metodou podle Ellmana a spol. (1961) na spektrofotometru Vitatron.

Hladina KS v plazmě byla měřena fluorimetrickou metodou (Mattingly, 1962) na spektrofluorimetru Aminco Bowman fy American Instrument Co. Aktivita TAT byla stanovována v 2% homogenátu jater spektrofotometrickou metodou (Diamondstone, 1966) na Vitatronu.

Aktivita cholinesteráz v krvi a mozku a TAT v játrech je uváděna v procentech vůči kontrolní hodnotě, hladina KS v plazmě je uváděna v absolutních hodnotách. Statistické hodnocení výsledků bylo prováděno nepárovým Studentovým t-testem na 5% hladině významnosti na počítači Hewlett Packard 9830 A.

Výsledky

Základní toxicitní parametry látky GV po i. per. podání jsou uvedeny v tab. 1. Z těchto hodnot vyplývá, že zvolené dávky látky GV 4 a 16 µg/kg odpovídají 10 a 40 % LD₅₀.

Tabulka 1

Toxikologická charakteristika látky GV

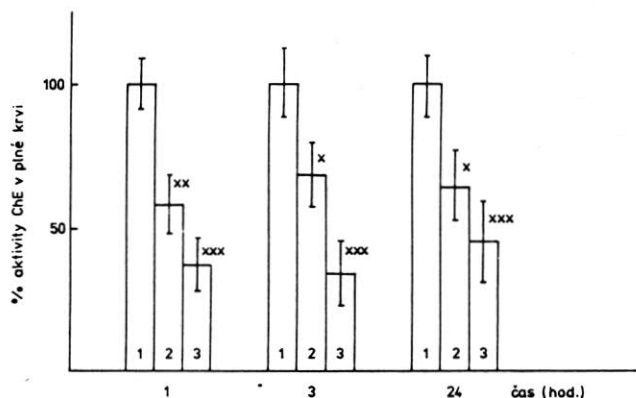
GV	potkan - samice
LD ₀₅	39,42 € (16,10 - 47,22) µg.kg ⁻¹
LD ₅₀	50,31 € (19,61 - 58,86) µg.kg ⁻¹
LD ₉₅	76,27 € (65,61 - 152,21) µg.kg ⁻¹
CT	4,98 € (4,21 - 5,85) min
LT	15,95 € (13,16 - 19,34) min

Po podání nižší dávky látky GV (4 µg/kg) nebyly do 24. hodiny zaznamenány žádné klinické příznaky intoxikace.

Naproti tomu po vyšší dávce látky GV došlo během první hodiny k plnému rozvoji muskarinových a nikotinových příznaků otravy, které do 3 hodin postupně odeznívají.

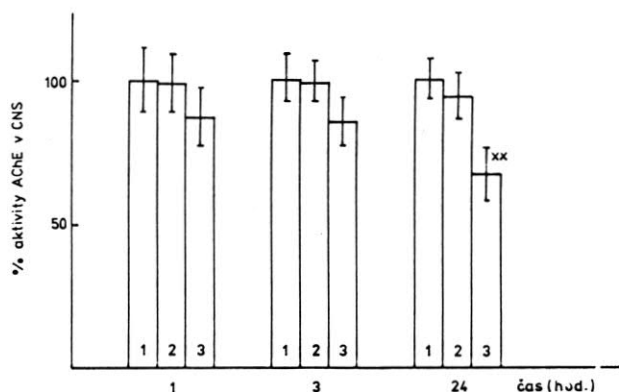
ChE v plné krvi je oběma dávkami látky GV výrazně inhibována. Po nižší dávce klesla aktivita ChE na 60 % kontrolních hodnot, po vyšší dávce klesla aktivita ChE až na 40 % kontrolních hodnot. Inhibice ChE přetrvávala do 24. hodiny intoxikace. V obou dávkových úrovních byl pokles aktivity ChE statisticky významný (obr. 1).

Naproti tomu v CNS klesla aktivita AChE po nižší dávce



Obr. 1 Změny aktivity ChE v plné krvi po i. per. podání subletálních dávek látky GV (kde 1 = kontrola, 2 = 4 µg/kg, 3 = 16 µg/kg). Statistická významnost: x = $p < 0,05$; xx = $p < 0,01$; xxx = $p < 0,001$

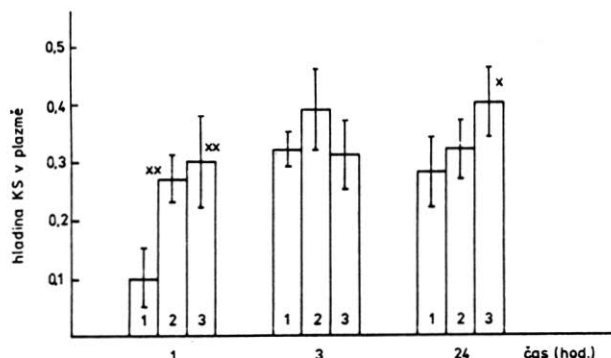
látky GV nepatrně, bez statistické významnosti. Nejvýraznější inhibice AChE v CNS po vyšší dávce látky GV byla pozorována až ve 24. hodině intoxikace, kdy aktivita AChE klesla na 67 % kontrolních hodnot. Tento pokles byl již statisticky významný ($p < 0,01$) (obr. 2).



Obr. 2 Změny aktivity AChE v CNS po i. per. podání subletálních dávek látky GV. Symboly - viz. obr. 1.

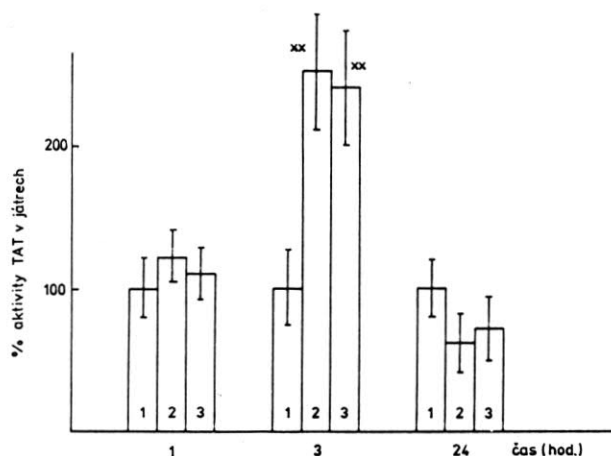
K signifikantnímu vzestupu hladiny KS v plazmě došlo po podání obou dávek látky GV v první hodině intoxikace. Na rozdíl od nižší dávky látky GV byl po vyšší dávce zaznamenán statisticky významný vzestup ($p < 0,05$) hladiny KS v plazmě ještě ve 24. hodině intoxikace (obr. 3).

Výrazné změny aktivity TAT v játrech byly po obou dávkách OF pozorovány ve 3. hodině intoxikace, kdy byl zaznamenán více než dvojnásobný vzestup této aktivity oproti kontrolním hodnotám ($p < 0,01$). V 1. a 24. hodině



Obr. 3 Změny hladiny KS v plazmě po i. per. podání subletálních dávek látky GV. Symboly - viz. obr. 1.

intoxikace se pohybovala aktivita TAT na úrovni kontrolních hodnot (obr. 4).



Obr. 4 Změny aktivity TAT v játrech po i. per. podání subletálních dávek látky GV. Symboly - viz. obr. 1.

Diskuse

Zatímco v krvi dochází k výrazné, statisticky významné inhibici ChE i po dávce látky GV, která způsobuje pouze latentní intoxikaci, v CNS dávka OF vedoucí k plnému rozvoji klinických příznaků intoxikace způsobuje signifikantní inhibici AChE až ve 24. hodině otravy. Rozdíl mezi inhibicí krevní ChE a mozkové AChE zřejmě souvisí s možným obtížným průnikem látky GV hematoencefalickou bariérou (HEB). Zdá se, že průběh intoxikace je významnější inhibice AChE v periferním nervovém systému (PNS). Vysoká inhibice krevní ChE svědčí o vysoké afinitě látky GV k cholinesterázám.

Signifikantní zvýšení hladiny KS v plazmě v 1. hodině intoxikace nastává i po dávce látky GV, která způsobuje pouze latentní intoxikaci. Po obou rozdílných dávkách OF byl vzestup hladiny KS obdobný. Nebyla tedy pozorována dávková závislost intenzity stresogenní odpovědi podobě jako v případě OFI Dichlorvosu (Kassa, 1987).

Na rozdíl od hladiny KS v plazmě dochází ke zvýšení aktivity TAT v játrech až ve třetí hodině intoxikace, což odpovídá představě, že změna aktivity TAT je ovlivněna

vána právě zvýšením hladiny KS (Németh a spol., 1973). Ani v případě TAT nebyla pozorována dávková závislost intenzity stresogenní odpovědi. I aktivita TAT v játrech signifikantně vzrůstá po dávce látky GV, která nezpůsobuje manifestní intoxikaci. Vybrané markry stresogenního účinku reagují na látku GV v dávkách vyvolávajících pouze latentní intoxikaci. Uvedené výsledky dostatečně dokumentují citlivost zvolených markerů necholinergních účinků látky GV, doplňujících etiopatogenezi intoxikace. Mohly by být též využity k upřesnění efektu terapie.

Stresogenní účinek látky GV je tedy biochemicky prokazatelný již při latentní intoxikaci stejně jako v případě OFI Dichlorvosu (Kassa, 1987).

Souhrn

V pokusech na samicích potkana byly studovány změny vybraných biochemických markerů stresogenního účinku (hladina kortikosteronu v plazmě a aktivita tyrozin aminotransferázy v játrech) vysoce toxické organofosforové sloučeniny 2-dimethyl-aminoethyl-(dimethylamido) fluorofosfátu (látky GV) v průběhu akutní intoxikace subletálními dávkami této noxy. Stresogenní účinek látky GV byl srovnáván s cholinergními účinky stejných dávek noxy - s inhibicí cholinesterázy v krvi a acetylcholinesterázy v CNS.

Po podání látky GV byla pozorována výrazná inhibice krevní cholinesterázy, ale jen mírná inhibice mozkové acetylcholinesterázy, statisticky významné zvýšení jak hladiny kortikosteronu v plazmě, tak aktivity tyrozin aminotransferázy v játrech. Toto zvýšení bylo zaznamenáno v dávce, která nevede k manifestní intoxikaci. Stresogenní účinek látky GV je tedy prokazatelný již v dávkách nevyvolávajících klinické příznaky intoxikace.

Literatura

1. BAJGAR, J.: Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie. *Novinky v medicíně*, 34, 1985, s. 5-40.
2. BAJGAR, J.: Biological monitoring of exposure to nerve agents. *Brit. J. Indust. Med.*, 49, 1992, s. 648-653.

3. BUSH, J. E.: Species differences in adrenocortical secretion. *J. Endocrinol.*, 9, 1953, s. 95.
4. DIAMONDSTONE, T. J.: Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydroxyphenylpyruvate to p-hydroxybenzaldehyde. *Analyt. Biochem.*, 16, 1966, s. 395-401.
5. ELLMAN, G. L. et al.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 1961, s. 88-95.
6. FENSKE, M.: Secretion of catecholamines, ascorbic acid, progesterone and corticosterone by in vitro superfusion from the adrenal of the mongolian gerbil. Effect of confinement stress. *Exp. clin. Endocrinol.*, 84, 1984, č. 2, s. 174-182.
7. HRDINA, V. et al.: Základní toxikologická charakteristika a vojenský význam potenciálních OL. [Závěr. výzk. zpráva]. Hradec Králové, VLA JEP 1990. 63 s.
8. KASSA, J.: Stresogenní účinek dichlorvosu. *Pracov. Lék.*, 39, 1987, č. 9, s. 406-411.
9. LIN, E. C. C. - KNOX W. E.: Adaptation of the rat liver tyrosine - alpha - ketoglutarate transaminase. *Biochem. Biophys. Acta*, 26, 1957, s. 85-88.
10. MATTINGLY, D.: A simple fluorimetric method for the estimation of free 1-deoxycorticoids in human plasma. *J. clin. Pathol.*, 15, 1962, s. 374-379.
11. NÉMETH, Š. - VIGAŠ, M. - STRAKOVÁ, A.: Time and level of increased plasma corticosterone necessary for induction of liver tyrosine aminotransferase in rats subjected to trauma. *Horm. metab. Res.*, 5, 1973, s. 283-285.
12. NÉMETH, Š.: Inhibitory effect of immobilization stress depression of liver tyrosine aminotransferase and tryptophan pyrrolase by glucose feeding in rats. *Endocr. Exp.*, 11, 1977, s. 43-48.
13. SOURKES, T. L.: Pathway of stress in the CNS. *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. and Psychiatr.*, 7, 1983, s. 389-411.
14. SZOT, R. J. - MURPHY, S. D.: Relationship between cyclic variation in adrenocortical secretory activity in rats and the adrenocortical response to toxic chemicals stress. *Environmental. Res.*, 4, 1971, s. 530-538.

Klíčová slova: GV látka; Acetylcholinesteráza; Kortikosteron; Tyrozin aminotransferáza.

Poděkování

Autor děkuje paní M. Karáskové a J. Petrové za technickou spolupráci a Mgr. V. Bláhovi za pomoc při statistickém hodnocení výsledků.

Do redakce došlo: 15. 2. 1993