

615.7/623.459/-099-08:615.9-085.525-092.9

SROVNÁNÍ LÉČEBNÝCH ÚČINKŮ HI-6 V KOMBINACI S BENAKTYZINEM A TOXOGONINU V KOMBINACI S ATROPINEM PŘI AKUTNÍ OTRAVĚ POTKANA LÁTKOU VX

Pplk. MUDr. Jiří KASSA, CSc.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové
(rektor: prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc.)

Úvod

Vysoce toxické organofosforové sloučeniny (OF) jsou již více než 40 let masově vyráběny a skladovány jako nervově paralytické látky (NPL). Zvláště toxickou NPL je látka VX (0-ethyl-S-[2-diisopropylaminoethyl] methylthiofosfonát), která vyniká především vysokou stálostí a snadným průnikem přes kůži (2).

Souběžně s výrobou těchto vysoce toxických OF probíhá intenzivní výzkum optimální terapie otrav NPL, která spočívá především v eliminaci cholinergních účinků NPL (OF). Základní antidotní léčba se skládá z reaktivátoru cholinesteráz (ChE) a cholinolytika (1). Asymetrický bispyridiniový oxim HI-6 [1(((4-(aminocarbonyl) pyridino)-methoxy) methyl-2-(hydroxyimino) methyl) pyridinium

dichlorid] patří mezi nejsledovanější reaktivátory ChE současnosti právě z důvodu velmi dobrého účinku proti NPL. Svým zásahem do cholinergních i necholinergních účinků OF překonává účinky dosud používaných reaktivátorů (3, 5, 12, 14, 18, 19). HI-6 obnovuje dostatek aktivní AChE především v bránici a interkostálních svalech, protože obtížně přestupuje přes hematoencefalickou bariéru (HEB) (14, 15, 16). Mezi periferní účinky HI-6 patří i alosterická inhibice muskarinových cholinergních receptorů, reaktive karboxyesteráz, snížení výměny cholinu a vazebnosti muskarinových receptorů (14, 18). Přes obtížný přestup HI-6 přes HEB byly pozorovány i centrální účinky HI-6 - stimulace respiračních a kardiovaskulárních center, ovlivnění hypotermie a konvulzivní aktivity mozku (9, 16).

Antidotní prostředky používané při terapii otrav NPL nebo vyvíjené pro terapii otrav NPL, tedy i VX látkou, svým zásahem do cholinergních účinků těchto vysoce toxických OF mohou ovlivnit i necholinergní účinky, které byly v průběhu akutních intoxikací opakovaně zaznamenány (6, 11). Mezi tyto necholinergní účinky patří i stresogenní efekt OF, představovaný aktivací hypothalamo - hypofyzeo - adrenální osy a sympatoadrenálního systému v důsledku rozvoje poruch homeostázy intoxikovaného organismu (17). Parametrem stresogenního účinku OF může být zvýšená hladina glukokortikoidů v plazmě v důsledku aktivace kory nadledvin a aktivita tyrozin aminotransferázy (TAT, EC 2.6.1.5) zvyšující se v důsledku hyperkortikosteronemie a realizující metabolický účinek glukokortikoidů stimulací glukoneogeneze (10).

Cílem této práce je srovnat účinek reaktivátoru HI-6 v kombinaci s centrálně působícím cholinolytikem benaktyzinem s účinkem klasické antidotní terapie (toxogonin + atropin sulfát), která je zavedena do AČR jako antidotum první pomoci při otravách NPL, tedy i proti otravě VX látkou. Ke srovnání účinnosti obou antidotních směsí byly využity změny cholinergních a necholinergních účinků VX látky v průběhu subletální intoxikace.

Materiál a metody

Pokusy byly prováděny na samcích bílého potkana kmene Wistar chovu Velaz Praha o hmotnosti 180-230 g. Pokusná zvířata byla krmena standardní Larsenovou dietou a vodou ad libitum.

VX látka byla pokusným zvířatům podávána intraperitoneálně (i. p.) v subletální dávce 20 µg/kg (40 % námi zjištěné LD₅₀) (10). Za 30 sekund po podání látky VX byli potkani léčeni buď reaktivátorem HI-6 (140 mg/kg) s benaktyzinem (37 mg/kg), nebo toxogoninem (36,2 mg/kg) s atropin sulfátem (258 mg/kg). Antidota byla podávána v maximálních terapeutických dávkách. Kontrolní zvířata dostávala místo noxy a antidot fyziologický roztok (F 1/1) ve stejném objemovém množství (0,1 ml/100 g). První, třetí a 24. hodinu léčene intoxikace byla laboratorní zvířata usmrcena dekapitací, byla jim odebrána krev, mozek, bránice a játra a v nich stanovena aktivita acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) a butyrylcholinesterázy (BuChE, EC 3.1.1.8), hladina korti-

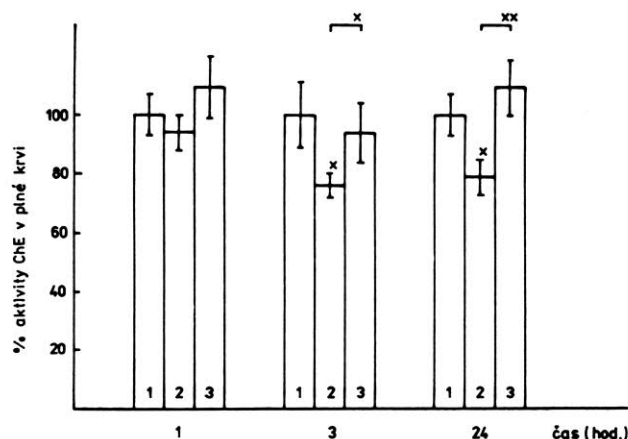
kosteronu (KS) - hlavního glukokortikoidu potkana (10) a aktivita TAT.

Aktivita AChE byla stanovována v mozku a bránici. V plné krvi byla stanovována aktivita obou cholinesteráz AChE i BuChE. Aktivita ChE byly měřeny spektrofotometrickou metodou podle Ellmana a spol. (8) na spektrofotometru Vitatron. Hladina KS v plazmě byla měřena radiochemickou metodou s využitím triciem značeného KS firmy Amersham (10). Aktivita TAT v játrech byla stanovována spektrofotometrickou metodou podle Diamondstona (7) na DU-8 spektrofotometru Beckman.

Statistické hodnocení získaných dat bylo prováděno pomocí analýzy rozptylu na počítači ADT 4500. Pokud byly rozdíly mezi skupinami (n = 6) statisticky významné (p < 0,05), byly údaje dále hodnoceny pomocí Scheffeho kontrastu.

Výsledky

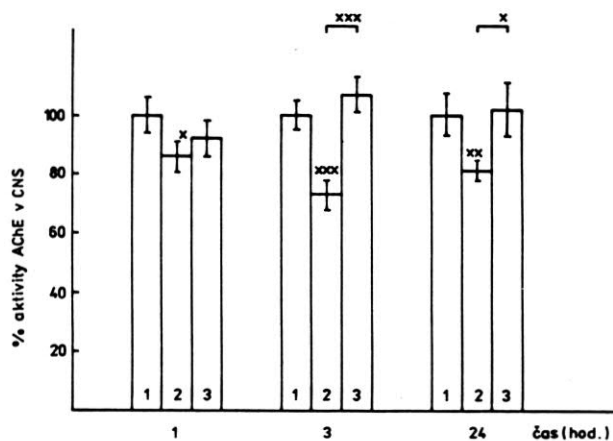
V případě léčení intoxikace látkou VX toxogoninem a atropinem klesla aktivita ChE v krvi na 75 % kontrolních hodnot a tento pokles přetrvával do 24. hodiny intoxikace (p < 0,05). Naproti tomu HI-6 s benaktyzinem dokázal eliminovat inhibiční účinky VX látky ve všech sledovaných časových intervalech (obr. 1).



Obr. 1 Změny aktivity ChE v plné krvi v průběhu subletální intoxikace látkou VX léčené toxogoninem s atropinem nebo HI-6 s benaktyzinem (1 - kontrola, 2 - terapie intoxikace toxogoninem s atropinem, 3 - terapie intoxikace HI-6 s benaktyzinem)
Statistická významnost: x - p < 0,05; xx - p < 0,01; xxx - p < 0,001

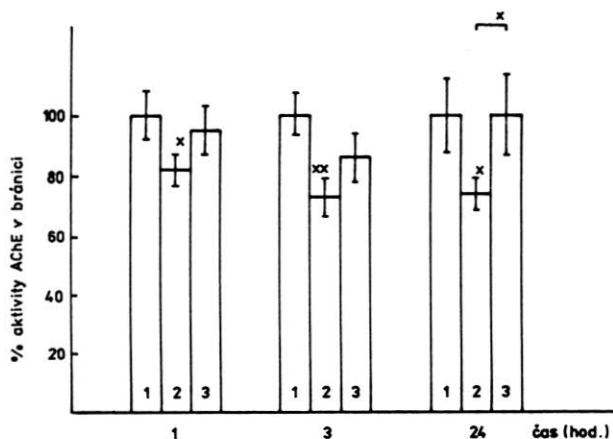
Podobně aktivita AChE v CNS signifikantně klesla ve všech sledovaných časových intervalech, pokud byla intoxikace VX látkou léčena toxogoninem a atropin sulfátem. Maximální inhibice AChE byla zaznamenána ve 3. hodině intoxikace (p < 0,001). V případě terapie intoxikace HI-6 s benaktyzinem neklesla aktivita mozkové AChE pod úroveň kontrolních hodnot v žádném ze sledovaných časových intervalů (obr. 2).

Prakticky totožný je vývoj aktivity AChE v bránici. V případě terapie intoxikace toxogoninem s atropin sulfátem signifikantně klesla aktivita AChE ve všech sledovaných časech s maximem ve 3. a 24. hodině intoxikace (p < 0,01). HI-6 s benaktyzinem opět zcela eliminoval inhibiční účinky VX látky ve všech sledovaných časech into-



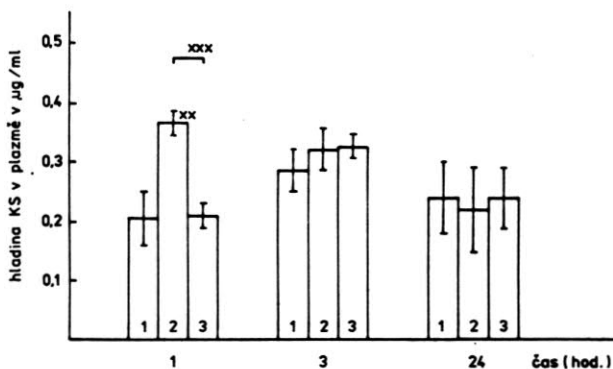
Obr. 2 Změny aktivity AChE v CNS v průběhu intoxikace VX látkou léčené toxogoninem s atropinem nebo HI-6 s benaktyzinem. Symboly a statistická významnost - viz obr. 1

xikace, takže aktivita brániční AChE neklesla pod úroveň kontrolních hodnot (obr. 3).



Obr. 3 Změny aktivity AChE v bránici v průběhu intoxikace látkou VX léčené toxogoninem s atropinem nebo HI-6 s benaktyzinem. Symboly a statistická významnost - viz obr. 1

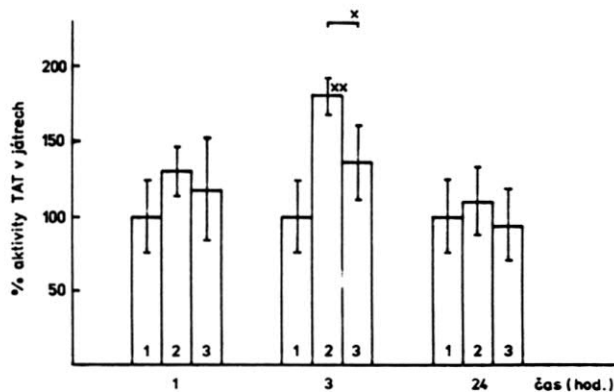
Rozdílný je též vliv kombinace antidot na necholinergní, stresogenní účinky VX látky. V první hodině intoxikace VX látkou léčené toxogoninem s atropin sulfátem byl zaznamenán statisticky významný vzestup hladiny KS



Obr. 4 Změny hladiny KS v plazmě v průběhu intoxikace látkou VX léčené toxogoninem s atropinem nebo HI-6 s benaktyzinem. Symboly a statistická významnost - viz obr. 1

v plazmě ($p < 0,01$). Naproti tomu v případě terapie intoxikace HI-6 s benaktyzinem nedošlo k hyperkortikosteronemii v žádném ze sledovaných časů intoxikace (obr. 4).

Změny aktivity TAT odpovídaly změnám KS v plazmě. Zřejmě v důsledku hyperkortikosteronemie dochází ve 3. hodině intoxikace léčené toxogoninem s atropinem ke statisticky významnému zvýšení aktivity TAT ($p < 0,01$), kdy aktivita TAT vzrostla na 1,5násobek. V případě terapie otravy HI-6 s benaktyzinem zůstává aktivita jaterní TAT na úrovni kontrolních hodnot ve všech sledovaných časových intervalech (obr. 5).



Obr. 5 Změny aktivity TAT v játrech v průběhu intoxikace VX látkou léčené toxogoninem s atropinem nebo HI-6 s benaktyzinem. Symboly a statistická významnost - viz obr. 1

Diskuse

Sledovaný vývoj aktivity cholinesteráz i markerů stresu prokázal více než jasně rozdílný účinek zvolených kombinací antidot. Toxogonin s atropinem nestačí v případě jednorázového podání eliminovat ireverzibilní inhibici cholinesteráz VX látkou v subletální dávce. HI-6 s benaktyzinem zcela eliminují inhibici aktivity cholinesteráz nejen v krvi a bránici (tedy na periférii), ale i v CNS, což je pozoruhodné vzhledem k malé reaktivní schopnosti HI-6 v CNS z důvodu obtížného přestupu HI-6 přes HEB (15). Získané výsledky jednoznačně svědčí o vyšší reaktivní účinnosti HI-6 ve srovnání s toxogoninem. Stejně vysoká reaktivní účinnost byla u HI-6 pozorována i v případě otravy somanem (4, 13).

V souladu s rozdílem při eliminaci cholinergních účinků látky VX v průběhu subletální intoxikace dochází k rozdílnému ovlivnění necholinergních, stresogenních účinků VX látky zvolenými kombinacemi antidot. Zatímco jednorázově podaný toxogonin s atropin sulfátem nezabránil vývoji hyperkortikosteronemie s následným zvýšením aktivity jaterní TAT, po podání HI-6 s benaktyzinem stresogenní účinek VX látky nenastává. Vytváří se pouze nespecifický stres daný manipulací se zvířaty a podáním látek do těla pokusného potkana jako u kontrolních zvířat. Výrazný periferní efekt HI-6 s benaktyzinem, který nespočívá pouze v reaktivaci AChE, ale i např. v přímém ovlivnění cholinergních receptorů (14, 18), zamezí zřejmě poruchám homeostázy

intoxikovaného organismu natolik, že sníží stresogenní účinek VX látky na úroveň nespecifického stresu, který se vyvíjí i u kontrolních zvířat.

Uvedené výsledky potvrzují, že antidota původně vyvíjená pouze k eliminaci cholinergních účinků OF mohou významně zasahovat i do necholinergních účinků OF, jako jsou stresogenní účinky. Přitom míra ovlivnění necholinergních účinků VX látky odpovídá obvykle míře ovlivnění inhibice cholinesteráz. Můžeme tedy antidota hodnotit nejen na základě přežívání zvířat po podání letálních a supraletálních dávek OF, na základě vývoje aktivity cholinesteráz, ale i na základě zásahu do vývoje necholinergních účinků OF.

HI-6 v kombinaci s benaktyzinem se jeví jako daleko účinnější kombinace pro terapii otravy VX látkou než dosud zavedené antidotum první pomoci - toxogonin s atropinem.

Souhrn

Effekt reaktivátoru HI-6 v kombinaci s cholinolytikem benaktyzinem a toxogoninu s atropin sulfátem na ireverzibilní inhibici cholinesteráz a stresogenní účinek látky VX byl sledován v pokusech na samcích bílého potkana. V průběhu akutní intoxikace potkanů látkou VX byl účinek antidot hodnocen prostřednictvím změn aktivity cholinesteráz v krvi, CNS a bránici a prostřednictvím změn markerů stresu - hladiny kortikosteronu v plazmě a aktivity tyrozin aminotransferázy v játrech.

Ve všech sledovaných orgánech byl jednoznačně prokázán výraznější reaktivací efekt HI-6 ve srovnání s toxogoninem. HI-6 v kombinaci s benaktyzinem na rozdíl od toxogoninu s atropinem zcela eliminoval cholinergní účinky VX látky v subletální dávce. Stejně tak reaktivátor HI-6 s benaktyzinem zabránil stresogenním účinkům VX látky, zatímco při terapii otravy toxogoninem s atropinem jsme zaznamenali hyperkortikosteronemii i vyšší aktivitu TAT.

Literatura

1. BAJGAR, J.: Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz - účinek, diagnóza a terapie. Novinky v medicíně, 1. vyd. Praha, Avicenum 1985. 40 s.
2. BAJGAR, J. - FUSEK, J. - HRDINA, V.: Vojenská toxikologie. Uč. texty, sv. 260. Hradec Králové, VLA JEP 1991. 80 s.
3. BOSCOVIČ, B. - KOVACEVIC, V. - JOVANOVIĆ, D.: 2-PAMCI, HI-6 and HGG-12 in soman and tabun poisoning. Fundam. appl. Toxicol., 4, 1984, s. S106 - S115.
4. CLEMENT, J. G.: Toxicology and pharmacology of bispyridinium

- oximes. Insight into the mechanism of action vs soman poisoning in vivo. Fundam. appl. Toxicol., 1, 1981, s. 193-202.
5. CLEMENT, J. G.: HI-6: reactivation of central and peripheral acetylcholinesterase following inhibition by soman, sarin and tabun in vivo in the rat. Biochem. Pharmacol., 31, 1982, s. 1283-1287.
6. CLEMENT, J. G.: Hormonal consequences of organophosphate poisoning. Fundam. appl. Toxicol., 5, 1985, s. S61-S77.
7. DIAMONDSTONE, T. L.: Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydroxyphenylpyruvate to p-hydroxybenzaldehyde. Anal. Biochem., 16, 1966, s. 395-401.
8. ELLMAN, G. L. et al.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., 7, 1961, s. 88-95.
9. HERMAN, P. M. et al.: Therapy of organophosphate poisoning in the rat by direct effects of oximes unrelated to ChE reactivation. Arch. Toxicol., 65, 1991, s. 586-593.
10. KASSA, J.: Studium cholinergních a necholinergních účinků organofosforových sloučenin a jejich léčebné ovlivnění. [Kandidátská disertace]. Hradec Králové 1991. 162 s. VLA JEP.
11. KASSA, J. - BAJGAR, J.: Cholinergní a necholinergní účinky organofosfátů. In: Sbor. věd. Práci VLA JEP Hradec Králové. 116. Hradec Králové 1993, s. 29.
12. LIPP, J. A. - DOLA, T. J.: Comparison of the efficacy of HS-6 versus HI-6 when combined with atropine, pyridostigmine and clonazepam for soman poisoning in monkeys. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 246, 1980, s. 138-148.
13. MAKSIMOVIĆ, M. et al.: Antidotal effects of bispyridinium-2-monoxime carbonyl derivatives in intoxication with highly toxic organophosphorus compounds. Acta pharm. Jugosl., 30, 1980, s. 151-160.
14. MAXWELL, D. M. - KOPLOVITZ, I.: Effect of endogenous carboxylesterase on HI-6 protection against soman toxicity. J. Pharmacol. exp. Ther., 254, 1990, s. 440-444.
15. MAXWELL, D. M. - BRECHT, K. M.: The role of carboxylesterase in species variation of oxime protection against soman. Neurosci. biobehav. Rev., 15, 1991, s. 135-139.
16. ROUSSEAU, C. G. - DUA, A. K.: Pharmacology of HI-6, an H-series oxime. Can. J. Physiol. Pharmacol., 67, 1989, s. 1183-1189.
17. SCHREIBER, V.: Stres. 1. vyd. Praha, Avicenum 1985. 260 s.
18. SHIH, T. M. - WHALLEY, Ch. E. - VALDES, J. J.: A comparison of cholinergic effects of HI-6 and pralidoxime-2-chloride (2-PAM) in soman poisoning. Toxicol. Lett., 55, 1991, s. 131-147.
19. WOLTHUIS, O. - BERENDS, F. - MELTER, E.: Problems in the therapy of soman poisoning. Fundam. appl. Toxicol., 1, 1981, s. 183-192.

Klíčová slova: VX látka; Toxogonin; HI-6; Atropin sulfát; Benaktyzin; Inhibice cholinesteráz; Kortikosteron; Tyrozin aminotransferáza; NPL.

Poděkování

Autoři děkují paní J. Petrové, J. Uhlířové a M. Zechovské za technickou spolupráci a Mgr. V. Bláhovi za pomoc při statistickém zpracování výsledků.

Do redakce došlo 18. 8. 1993