

ALTERNATIVNÍ PŘÍSTUPY KE KAUZÁLNÍ TERAPII AKUTNÍCH OTRAV NERVOVĚ PARALYTICKÝMI LÁTKAMI

Pplk. doc. MUDr. Jiří KASSA, CSc., pplk. Ing. Jiří CABAL, CSc., doc. RNDr. Jiří PATOČKA, DrSc.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové
(rektor: plk. doc. MUDr. Svatopluk Býma, CSc.)

Kauzální terapie akutních otrav NPL

Objev vysoce toxických organofosforových sloučenin před téměř 50 lety vedl rychle k jejich masové výrobě za účelem výroby chemických zbraní určených k ničení živé síly ve válečném konfliktu. Navíc se stejné látky, které byly zařazeny mezi nervově paralytické látky (NPL) staly terčem zájmu pro síly terorismu, jak ukázaly nedávné útoky teroristů proti civilnímu obyvatelstvu v Japonsku (21).

V okamžiku, kdy začaly být NPL vyráběny jako náplň pro chemickou municí, začalo i hledání účinných forem ochrany před jejich účinky. Více než 40letý výzkum mechanismu účinku NPL a projevů poškození zdraví po akutní expozici těmito látkami na teplokrevných organismech umožnil vývoj kauzální antidotní terapie, která zasahuje přímo do základního mechanismu účinku NPL - ireverzibilní inhibice acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) s následnou akumulací acetylcholinu (ACh) vedoucí ke generalizované hyperstimulaci cholinergních receptorů v periferním i centrálním nervovém systému (2, 20).

Základní antidotní terapie akutní intoxikace NPL se skládá ze dvou skupin antidotů:

- anticholinergik, antagonistů ACh, eliminujících účinek ACh na cholinergních receptorech a
- reaktivátory AChE, nazývaných podle své chemické struktury oximy, které obnovují aktivitu NPL - inhibované AChE (6).

Přestože je tato terapie zaměřena přímo proti vlastnímu toxickému účinku NPL, není vždy dostatečně účinná. Existují NPL, jejichž toxicita je touto antidotní terapií obtížně a často nedostatečně eliminována. Za vůbec nejobtížněji léčitelnou otravu NPL je považována otrava somanem (pinakolylmethylfluorofosfonát) (3, 16, 18, 25). Za příčinu nedostatečného účinku antidotní terapie je považována především:

- rychlá dealkylace NPL kovalentně vázané na AChE (v anglosaské literatuře se častěji používá pojem „stárnutí“ - aging), která znemožňuje reaktivaci NPL - inhibované AChE, a
- postupné uvolňování NPL z depotních míst, které vede k reinhibici již jednou reaktivované AChE v pozdějších fázích akutní intoxikace (6, 7, 15).

Nejčastěji se snaha o zvýšení efektu antidotní terapie akutních intoxikací NPL dosud ubírala cestou vývoje nových reaktivátorů AChE. Protože

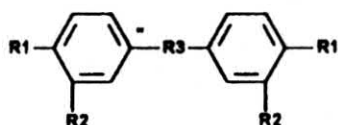
se klasické reaktivátory cholinesteráz (pralidoxim, obidoxim) ukázaly jako prakticky neúčinné při experimentálních terapiích akutních intoxikací obtížně léčitelnými NPL, začala být počátkem 80. let intenzivně zkoumána jiná skupina reaktivátorů AChE - asymetrické bispyridiniové oximy, nazvaná podle svého objevitele prof. Hagedorna „H-oximy“, neboť se zdálo být účinnější v terapii akutních intoxikací NPL než dosud používané oximy (4, 19, 24).

Nejvíce sledovaným H-oximem se bezesporu stal oxim HI-6, který je toho času považován za dosud nejúčinnější reaktivátor AChE pro terapii akutních intoxikací NPL, zvláště somanem (16, 18, 24, 25). Zdá se, že se na terapeutickém efektu oximu HI-6 uplatňují vedle reaktivity inhibované AChE i další, sekundární antidotní efekty, jako je ganglium blokující a antimuskarinový účinek nebo přímý farmakologický účinek vedoucí k restauraci NPL - indukované periferní či centrální deprese respirace a cirkulace (24, 28). Přes výše uvedený rozsah pozitivních zásahů oximu HI-6 do mechanismu účinku NPL není terapeutický efekt ani tohoto reaktivátoru AChE v kombinaci s anticholinergikem uspokojivý, zvláště při terapii akutní otravy somanem (4, 18, 24).

Vedle vývoje kauzálních a funkčních antidotů jsou proto hledány i jiné, alternativní přístupy ke zvyšování efektu antidotní léčby akutních intoxikací NPL. Jedním z těchto přístupů je výzkum sloučenin, které by eliminovaly NPL - indukovanou hyperstimulaci cholinergního nervového systému mechanismem odlišným od reaktivity AChE nebo které by ovlivnily rychlost dealkylace NPL kovalentně vázané na AChE, a tak prodloužily efekt vlastních reaktivátorů AChE.

Neoximové bispyridiniové sloučeniny

K jedné ze skupin takových látek patří i bispyridiniové sloučeniny neobsahující oximovou skupinu. Nejvíce studovanou látkou této skupiny potenciálních léčiv otrav NPL je SAD-128 (látko II, obr. 1). Při studiu účinků SAD-128 se ukázalo, že tato látka může přispět k efektu antidotní terapie otrav NPL díky ochraně aktivního centra AChE před zásahem NPL cestou reverzibilní inhibice tohoto enzymu (1, 26), díky zpomalení dealkylace NPL kovalentně vázané na AChE cestou alosterické modifikace aktivního centra AChE, díky blokádě iontových



LÁTKA	KÓDOVÉ OZNAČENÍ	SUBSTITUENTY		
		R1	R2	R3
I	BPE	H	H	-CH ₂ -O-CH ₂ -
II	SAD-128	t-Bu	H	-CH ₂ -O-CH ₂ -
III	HS-8	H	CONH ₂	-CH ₂ -O-CH ₂ -
IV	P-85	t-Bu	H	-(CH ₂) ₆ -
V	OS-21	CH ₃	H	-CH ₂ -O-CH ₂ -
VI	OS-22	Et	H	-CH ₂ -O-CH ₂ -

Obr. 1 Chemická struktura neoximových bispyridiniových sloučenin

kanálů nikotinových receptorů (1, 27) a konečně díky urychlení oximem indukované reaktivace inhibované AChE (11). Ochranný účinek SAD-128 vůči AChE je zřejmě spojen se strukturálními změnami aktivního místa enzymu a změnami viskozity membrány, na kterou je AChE vázána (26). Navíc se ukázalo, že SAD-128 je schopen snížit maximální vazebnou kapacitu muskarinových receptorů díky hydrofobním substituentům v poloze 4 a 4' na pyridiniovém kruhu (17).

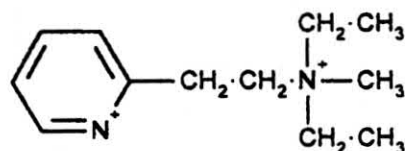
Sám o sobě SAD-128 příliš průběh akutní intoxikace NPL neovlivnil, ať už byl podán preventivně, či následně. Zásah SAD-128 do cholinergního přenosu nervového vzruchu se pozitivně projevil jediné v kombinaci s klasickou antidotní terapií (5, 10). Bylo prokázáno, že SAD-128 může významně zvýšit HI-6 - indukovanou reaktivaci somanem inhibované AChE v lidském svalu (5). Stejný efekt však nebyl pozorován u svalů potkana, a to zřejmě proto, že ve svalů potkana probíhá dealkylace somanem inhibované AChE pomaleji než u člověka a oxim HI-6 nemá tak ztížené podmínky k reaktivaci somanem inhibované AChE jako u člověka (29).

SAD-128 může tedy podle některých autorů v určitých případech zvýšit reaktivační efekt oximů, ale sám o sobě není nijak účinným antidotem proti akutní otravě NPL. Bispyridiniových sloučenin neoximového typu bylo připraveno více (látky I, III-VI, viz obr. 1.) (14, 22), ale žádná z nich neprokázala lepší efekt než SAD-128 (14). Byl také *in vitro* experimentálně ověřován protektivní účinek těchto látek na inhibici AChE karbamáty (22).

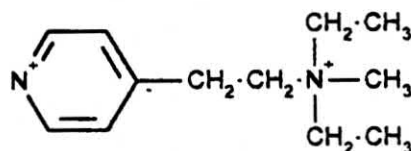
Kvarterní amoniové alkylující sloučeniny

Dalším způsobem, jak zmírnit negativní důsledky rychlé dealkylace NPL inhibované AChE pro efekt

antidotní terapie, je nalézt látku schopnou realkylovat fosfonátový iont dealkylovaného komplexu NPL-AChE. Takovou látku se dosud nepodařilo objevit, ale při jejím hledání bylo zjištěno, že některé sloučeniny patřící mezi kvarterní amoniové alkylující sloučeniny mohou alespoň signifikantně dealkylaci NPL kovalentně vázané na AChE zpomalit. Patří mezi ně především látky VII a VIII (obr. 2) (8).



VII



VIII

Obr. 2 Chemická struktura kvarterních amoniových alkylujících sloučenin

V případě otravy somanem následuje rychle po fosforylaci serinového hydroxylu aktivního centra AChE ztráta pinakolylové skupiny zanechávající fosfonátový aniont připojený k enzymu. Fosfonátový aniont je nepřístupný nukleofilnímu útoku oximem na rozdíl od neutrálního esteru, a proto nemůže být oddělen od aktivního centra AChE. Schopnost zpomalit dealkylaci (ztrátu pinakolylové skupiny) somanu kovalentně vázaného na AChE výše uvedenými sloučeninami byla testována *in vitro* na erythrocytech potkana. Ze srovnání efektu oximu 2-PAM na somanem inhibovanou erythrocytární AChE za přítomnosti a bez přítomnosti testovaných látek vyplývá, že obě kvarterní amoniové alkylující sloučeniny významně snižují rychlostní konstantu dealkylace somanu kovalentně vázaného na AChE, a zvyšují tak reaktivační účinnost použitého oximu 2-PAM (hladina významnosti $p < 0,005$ v případě látky VII, $p < 0,001$ v případě látky VIII) (8).

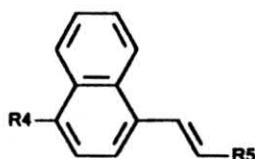
Není dosud jasné, jakým mechanismem tyto látky dealkylaci NPL kovalentně vázané na AChE zpomalují. Předpokládá se, že mohou působit alosterickým efektem na fosforylovaný enzym, kterým blokují aktivační funkci imidazolové skupiny v blízkosti serinového hydroxylu, a tak znemožní následnou kyselou katalýzu procesu dealkylace. Zpomalení procesu dealkylace NPL kovalentně vázané na AChE poskytne potom více času pro reaktivaci NPL - inhibované AChE. To znamená, že praktický

význam mohou mít tyto sloučeniny pouze v případě jejich profylaktického podání kombinovaného s následnou klasickou antidotní terapií. Samy o sobě by byly vůči toxicitě NPL neúčinné.

Naftylvinyl pyridiny

Třetí skupinou látek, které byly sledovány za účelem jejich využití pro antidotní terapii akutních otrav NPL, jsou deriváty naftylvinyl pyridinu. Důvodem pro jejich zkoumání bylo zjištění, že některé látky z této skupiny jsou schopny inhibovat enzym cholinacetyltransferázu (ChAT, EC 2.3.1.6), který zajišťuje syntézu ACh, což by mohlo vést ke zmírnění „endogenní intoxikace acetylcholinem“, která se rozhodující měrou podílí na rozvoji akutní intoxikace NPL. Navíc se některé deriváty naftylvinyl pyridinu vyznačují schopností zpomalit průběh dealkylace NPL kovalentně vázané na AChE podobně jako výše zmíněné kvarterní amoniové alkylující sloučeniny (9, 13).

Nejslibnějšími látkami ve smyslu signifikantního ovlivnění antidotní terapie akutních otrav NPL se ukázaly látky IX, X a XI (obr. 3) (9).



LÁTKA	SUBSTITUENTY	
	R4	R5
IX	H	
X	H	
XI	H	
XII	OCH3	

Obr. 3 Chemická struktura naftylvinyl pyridinů

Všechny tři sloučeniny byly testovány proti NPL sarinu a somanu. Byl zkoumán jejich vliv na účinek klasické antidotní terapie akutní intoxikace NPL *in vivo* na myších a morčatech. V případě intoxikace myši somanem žádná z testovaných látek signifikantně neovlivnila efekt antidotní terapie (atropin

sulfát + 2-PAM), zato v případě léčené akutní intoxikace myši sarinem signifikantně zvýšila efekt antidot (atropin sulfát + 2-PAM), které byly podávány 10 minut před intoxikací, látka IX (vzestup indexu účinnosti z 1,22 na 1,66) a látka XI (vzestup indexu účinnosti z 1,22 na 1,74). Přitom naftylvinyl pyridiny byly podávány současně s antidoty. Jedině látka X nevedla k signifikantnímu zlepšení efektu antidotní terapie otravy sarinem (9).

V případě testování efektu výše uvedených sloučenin na účinnost léčby akutní intoxikace somanem u morčat byly účinné všechny tři sloučeniny, avšak pouze v případě, že vedle antidot (atropin sulfát + 2-PAM), podaných 10 minut před intoxikací, byl k léčbě přidán pyridostigmin (30 minut před intoxikací). Naftylvinyl pyridiny byly podávány společně s pyridostigminem. Přidání látky IX k léčbě vedlo ke zvýšení indexu účinnosti ze 7,63 na 14, přidání látky X ke zvýšení indexu účinnosti ze 7,63 na 19 a přidání látky XI dokonce ke zvýšení indexu účinnosti ze 7,63 na 31. Přitom látka XI, která se ukázala v těchto experimentech jako neúčinnější, nevykazuje žádnou inhibiční aktivitu vůči ChAT. Látka X je sice schopna inhibovat ChAT, ale tato inhibice zase není doprovázena odpovídajícím snížením hladiny ACh (13). Zdá se tedy, že inhibice enzymu ChAT není tou pravou příčinou pozitivního zásahu naftylvinyl pyridinů do akutní intoxikace NPL.

Nebyla prokázána ani spojitost mezi druhým uvažovaným mechanismem účinku naftylvinyl pyridinů (zpomalením procesu dealkylace NPL kovalentně vázané na AChE) a pozitivním zásahem do účinku klasické antidotní terapie akutních intoxikací NPL, neboť nejefektivnější derivát naftylvinyl pyridinu ve smyslu zpomalení procesu dealkylace NPL kovalentně vázané na AChE - látka XII - nevykázala u myši žádnou signifikantní ochranu před somanem (9).

U látky XI, která se jevila v pokusech na morčatech jako nejefektivnější, byl navíc zjištěn efekt na kalciové kanály. Inhibice kalciových kanálů látkou XI, doprovázená hypotenzí, pozorovaná v pokusech na kočkách (12) by také mohla přispět k mechanismu ochrany před toxicitou NPL.

Výzkum derivátů naftylvinyl pyridinu ukázal, že v určitých případech sice mohou tyto sloučeniny pozitivně ovlivnit účinek antidotní léčby při terapii akutních intoxikací NPL, ale pouze při profylaktickém podání jak antidot, tak naftylvinyl pyridinů.

Závěr

Kritické zhodnocení všech tří testovaných skupin látek (neoximové bispyridiniové sloučeniny, kvarterní amoniové alkylující sloučeniny, deriváty naftylvinyl pyridinu) nás vede k závěru, že ani jedna z těchto sloučenin sama o sobě nebude praktickým přínosem k léčebně odsunovému zabezpečení zasažených NPL.

Souhrn

V úvodní části přehledného článku je stručně popsán vývoj klasické antidotní terapie akutní intoxikace nervově paralytickými látkami a její stávající možnosti. Tato terapie je v další části pojednání srovnávána s možnostmi využití jiných, z hlediska mechanismu účinku odlišných látek, pro terapii akutních intoxikací těmito noxami - bispyridiniové sloučeniny neobsahující oximovou skupinu, kvarterní amoniové alkylovací sloučeniny a deriváty naftylvinyl pyridinu. Kritické zhodnocení protektivního účinku těchto sloučenin vůči toxicitě NPL nás vede k závěru, že přes určité náznaky pozitivního vlivu na efekt klasické antidotní terapie není jejich praktické uplatnění při léčbě odsunovém zabezpečení zasažených NPL příliš reálné.

Literatura

1. ALKONDON, M. - ALBUQUERQUE, EX.: The nonoxime bispyridinium compound SAD-128 alters the kinetic properties of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel: a possible mechanism for antidotal effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1989, vol. 250, p. 842-852.
2. BAJGAR, J.: Otrava organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie. *Novinky v medicíně*, 1985, roč. 34, s. 5-40.
3. BOSKOVIČ, B. - KOVACEVIČ, V. - JOVANOVIČ, D.: 2-PAMCI, HI-6 and HGG-12 in soman and tabun poisoning. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1984, vol. 4, p. S106-S115.
4. CLEMENT, JC.: Pharmacology and toxicology of bispyridinium oximes. Insight into mechanism of action vs. soman poisoning in vivo. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1981, vol. 1, p. 193-202.
5. CLEMENT, JC. - ERHARDT, N.: In vitro oxime - induced reactivation of various molecular forms of soman - inhibited acetylcholinesterase in striated muscle from rat, monkey and human. *Arch. Toxicol.*, 1994, vol. 68, p. 648-655.
6. DAWSON, RM.: Review of oximes available for the treatment of nerve agent poisoning. *J. Appl. Toxicol.*, 1994, vol. 14, p. 317-331.
7. FLEISCHER, JH. - HARRIS, LW.: Dealkylation as a mechanism for aging of cholinesterase after poisoning with pinacolyl methylphosphonofluoridate. *Biochem. Pharmacol.*, 1965, vol. 14, p. 641-649.
8. GRAY, AP., et al.: Synthesis of some quaternary ammonium alkylating agents and their effects on soman - inhibited acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.*, 1985, vol. 28, p. 111-116.
9. GRAY, AP., et al.: Approaches to protection against nerve agent poisoning. (Naphtylvinyl) pyridine derivatives as potential antidotes. *J. Med. Chem.*, 1988, vol. 31, p. 807-814.
10. GRUBIČ, Z. - TOMAŽIČ, A.: Mechanism of action of HI-6 on soman inhibition of acetylcholinesterase in preparations of rat and human skeletal muscle; comparison to SAD-128 and 2-PAM. *Arch. Toxicol.*, 1989, vol. 63, p. 68-71.
11. HARRIS, LW., et al.: Effects of 1,1'-oxydimethylene bis - (4-tert-butylpyridinium chloride) (SAD-128) and decamethonium on reactivation of soman and sarin - inhibited cholinesterase by oximes. *Biochem. Pharmacol.*, 1978, vol. 27, p. 757-761.
12. HENDERSON, TR., et al.: Cardiovascular effects of 1-methyl-4-(1-naphtylvinyl) piperidine hydrochloride. *Eur. J. Pharmacol.*, 1988, vol. 158, p. 149-152.
13. HENDERSON, TR., et al.: Inhibition of brain choline acetyltransferase in vivo: (E)-1-methyl-4-(1-naphtylvinyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride (B 115), a depot form of a potent inhibitor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1991, vol. 107, p. 336-343.
14. INNS, RH. - LEADBEATER, L.: The efficacy of bispyridinium derivatives in the treatment of organophosphate poisoning in the guinea-pig. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1983, vol. 35, p. 427-433.
15. KADAR, T., et al.: Distribution of ³H-soman in mice. *Arch. Toxicol.*, 1985, vol. 58, p. 45-49.
16. KASSA, J.: Comparison of efficacy of two oximes (HI-6 and obidoxime) in soman poisoning in rats. *Toxicology*, 1995, vol. 101, p. 167-174.
17. KLOOG, Y., et al.: Reversible and irreversible inhibition of rat brain muscarinic receptors is related to different substitutions on bisquaternary pyridinium oximes. *Arch. Toxicol.*, 1985, vol. 58, p. 37-39.
18. KOPLOVITZ, I. - STEWART, JR.: A comparison of the efficacy of HI-6 and 2-PAM against soman, tabun, sarin and VX in the rabbit. *Toxicol. Lett.*, 1994, vol. 70, p. 269-279.
19. MAKSIMOVIČ, M., et al.: Antidotal effects of bispyridinium-2-monoxime carbonyl derivatives in intoxication with highly toxic organophosphorus compounds. *Acta Pharm. Jugosl.*, 1980, vol. 30, p. 151-156.
20. MARRS, TC.: Organophosphate poisoning. *Pharm. Ther.*, 1993, vol. 58, p. 51-66.
21. OHTOMI, S. - TAKASE, M. - KUMAGAI, F.: Sarin poisoning in Japan. A clinical experience in Japan Self Defense Force (JSDF) Central Hospital. *Int. Rev. Arm. For. Med. Ser.*, 1996, vol. 69, p. 97-102.
22. PATOČKA, J. - BAJGAR, J.: Protective effect of bispyridinium compounds of the rat brain acetylcholinesterase inhibition by carbamate in vitro. *Biomed. Biochim. Acta*, 1987, vol. 46, p. 455-459.
23. PUU, G. - ARTURSSON, E. - BUCHT, G.: Reactivation of nerve agent inhibited human acetylcholinesterases by HI-6 and obidoxime. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 1986, vol. 35, p. 1505-1510.
24. ROUSSEAU, CG. - DUA, AK.: Pharmacology of HI-6, an H series oxime. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1989, vol. 67, p. 1183-1189.
25. SHIH, TM. - WHALLEY, CHE. - VALDES, JJ.: A comparison of cholinergic effects of HI-6 and pralidoxime-2-chloride (2-PAM) in soman poisoning. *Toxicol. Lett.*, 1991, vol. 55, p. 131-147.
26. STALC, A. - SENTJURC, M.: A contribution to the mechanism of action of SAD-128. *Biochem Pharmacol.*, 1990, vol. 40, p. 2511-2517.
27. TATTERSALL, JEH.: Ion channel blockade by oximes and recovery of diaphragm muscle from soman poisoning in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 1993, vol. 108, p. 1006-1015.
28. VAN HELDEN, HPM., et al.: Therapy of organophosphate poisoning in the rat by direct effects of oximes unrelated to ChE-reactivation. *Arch. Toxicol.*, 1991, vol. 65, p. 586-593.
29. VAN HELDEN, HPM., et al.: Pharmacological effects of oximes: how relevant are they? *Arch. Toxicol.*, 1996, vol. 70, p. 779-786.

Klíčová slova: Nervově paralytické látky; Reaktivátory acetylcholinesterázy; SAD-128; Kvarterní alkylovací amoniové sloučeniny; Deriváty naftylvinyl pyridinu.

Do redakce došlo 6. 3. 1997