

CHRONICKÝ STRESOGENNÍ EFEKT NÍZKÝCH DÁVEK SARINU U POTKANA PO JEDNORÁZOVÉ ČI OPAKOVANÉ INHALAČNÍ EXPOZICI

Jiří KASSA, Marcela BIELAVSKÁ, Josef VACHEK

Katedra toxikologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

Souhrn

V pokusech na samcích potkana byl studován stresogenní efekt vysoce toxického organofosfátu sarinu po jednorázové či opakované inhalační expozici nízkým dávkám této noxy cestou monitorování hladin kortikosteronu v plazmě, aktivity tyrozin aminotransferázy v játrech a hladin katecholaminů či jejich metabolitů v mozku.

Zatímco ve třech a dvanácti měsících po jednorázové či opakované expozici potkana nízkým dávkám sarinu bylo zjištěno statisticky významné zvýšení hladin některých markerů stresu ve srovnání s kontrolními potkany nejen po expozici klinicky manifestní, nadprahové dávce sarinu, ale také po expozici klinicky latentní, podprahové dávce sarinu, v šesti měsících po expozici potkanů stejným dávkám sarinu signifikantní zvýšení ukazatelů stresu nebylo pozorováno.

Výše uvedené výsledky prokazují možnost dlouhodobého stresogenního efektu sarinu u laboratorního potkana i po expozici nízkým, asymptomatickým dávkám této vysoce toxické noxy, i když se tento stresogenní efekt neprojevil ve všech sledovaných časových intervalech po expozici.

Klíčová slova: Sarin; Inhalační expozice; Kortikosteron; Tyrozin aminotransferáza; Katecholaminy.

Chronic Stressogenic Effect of Low Doses of Sarin in a Rat after a Single or Repeated Inhalation Exposure

Summary

The stressogenic effect of highly toxic organophosphate sarin following single or repeated inhalation exposure to low doses of sarin by monitoring the corticosterone level in plasma, the tyrosine aminotransferase activity in liver as well as the level of catecholamines and their metabolites in the brain was studied in rats.

While the statistically significant increase in the level of some stress markers at three and twelve months following the inhalation exposure not only to symptomatic but also to asymptomatic doses of sarin was observed in comparison with the control values, no changes in stress markers at six months following the inhalation exposure were demonstrated in sarin exposed rats in comparison with the control values.

Therefore, our results confirm the possibility of long-term stressogenic effects of sarin following low-level exposure in rats, although these effects were not observed at all time intervals studied.

Key words: Sarin; Inhalation exposure; Corticosterone; Tyrosine aminotransferase; Catecholamines.

Úvod

Komplexní mechanismus účinku organofosforových (OF) sloučenin zahrnuje vedle hyperstimulace centrálního i periferního cholinergního nervového systému v důsledku ireverzibilní inhibice acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) a následné akumulace acetylcholinu na cholinergních synapsích (15) i celou řadu nespecifických, necholinergních účinků včetně účinku stresogenního, vyvolaného pravděpodobně poruchou homeostázy a zhroucením energetického metabolismu (3, 14). Reakce teplokrevného organismu na stresogenní podnět je obecně charakterizována především zvýšením aktivity hypothalamo-hypofyzeo-adrenální osy a sympatoadrenálního systému. Hlavní známkou aktivace hypothalamo-hypofyzeo-adrenální osy je zvýšení hladiny glukokortikoidů v plazmě, aktivace sympatoadrenálního systému je charakterizována zvýšením hladiny katecholaminů a jejich metabolitů v plazmě a mozkové tkáni (19).

Statisticky významný stresogenní efekt vysoce toxických OF sloučenin nazývaných nervově paralytické látky (NPL), které mohou být zneužity k válečným či teroristickým účelům, byl popsán především v průběhu akutní intoxikace experimentálních zvířat letálními, subletálními nebo alespoň klinicky manifestními dávkami těchto tox (11, 13), avšak nebyl dosud sledován po expozici nízkým, klinicky asymptomatickým dávkám. V důsledku zjištění různorodých dlouhodobých zdravotních potíží veteránů války v Perském zálivu, jejichž původ dosud nebyl vysvětlen, byla nastolena otázka možného spojení těchto obtíží s expozicí buď nízkým dávkám NPL nebo organofosforovým insekticidům, či s dlouhodobým užíváním reverzibilního inhibitoru cholinesteráz pyridostigmin bromidu jako profylaxe akutních otrav NPL (7, 8, 9). Z tohoto důvodu bylo v několika výzkumných centrech zahájeno zkoumání možných dlouhodobých účinků nízkých dávek NPL, které samy o sobě nevyvolávají klinicky zjevnou hyperstimulaci cholinergního nervového systému při jednorázové či opakované expozici.

Cílem této práce bylo zjistit možný dlouhodobý stresogenní efekt nízkých dávek NPL. Jako představitel NPL byl zvolen sarin (O-izopropyl methylfluorofosfonát) a jako způsob intoxikace inhalační expozice, neboť právě o inhalační expozici nízkým dávkám sarinu uvolněnému do ovzduší během destrukce iráckých skladů chemické munice se uva-

žovalo u veteránů války v Perském zálivu. Stresogenní účinky sarinu byly sledovány prostřednictvím hladiny kortikosteronu (KS) v plazmě, aktivity tyrozin aminotransferázy (TAT, EC 2.6.1.5), jednoho z enzymů realizujících metabolický účinek KS (2, 17) v játrech a hladin katecholaminů a jejich metabolitů v mozku.

Materiál a metody

Jako pokusná zvířata byli použiti samci bílých potkanů SPF chovu Konárovice o hmotnosti 180 až 200 g. Potkani byli ustájeni v bariérovém chovu v Těchoníně a krmeni předem sterilizovanou dietou a vodou ad libitum.

Potkani rozdělení do skupin po 10 kusech byli exponováni nízkým dávkám sarinu v inhalační komoře po dobu 60 minut. Dávky sarinu byly voleny tak, aby při 60minutové inhalační expozici způsobovaly pouze mírnou inhibici AChE, která ještě nevede ke klinické manifestaci intoxikace. Celkem byly použity 3 dávky sarinu:

- *Podprahová dávka* způsobující minimální, statisticky nevýznamnou inhibici erytrocytární AChE (pod 20 %) bez klinických projevů otravy (0,8 µg/l).
- *Prahová dávka* způsobující statisticky významnou, ale mírnou inhibici erytrocytární AChE (20-40 %) bez klinických projevů otravy (1,25 µg/l). Tato dávka sarinu byla použita pro jednorázovou i opakovanou expozici (3krát během jednoho týdne).
- *Nadprahová dávka* způsobující již výraznější inhibici erytrocytární AChE (40-50 %) s mírnými klinickými projevy otravy muskarinového charakteru, avšak bez konvulzivního účinku (2,5 µg/l).

Po 3, 6 nebo 12 měsících po expozici sarinu byli potkani usmrceni exsanguinací v celkové éterové narkóze a byly jim odebrány krev, játra a mozek k laboratorní analýze. Hladina kortikosteronu (KS) byla stanovována v plazmě fluorimetrickou metodou podle Mattingliho (16) na fluorimetru firmy Aminco-Bowman, aktivita TAT v játrech byla měřena spektrofotometrickou metodou podle Diamondstona (4) na spektrofotometru UVIKON 942 firmy Kontron Instruments, hladiny katecholaminů byly stanovovány v mozkové tkáni pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí při použití detektoru Coulchem II (20, 21, 22).

Z katecholaminů byly stanovovány dopamin (DA), serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT) a jejich metabolity: kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová

(DOPAC), 3-methoxytyramin (3-MT), kyselina homovanilinová (HVA) a kyselina 5-hydroxyindol-octová (5-HIAA).

Statistické hodnocení získaných údajů bylo prováděno na počítači ADT 4500 cestou analýzy rozptylu. Pokud byly rozdíly mezi kontrolními a experimentálními hodnotami statisticky významné na 95% hladině významnosti ($p < 0,05$), byly údaje dále hodnoceny Scheffého kontrastem (1). Kontrolní údaje byly získány od potkanů, kteří byli exponováni v inhalační komoře čistému vzduchu místo sarinu.

Výsledky

Srovnání změn stresogenních ukazatelů vyvolaných účinkem stresoru (v našem případě uvedením do celkové éterové narkózy) u kontrolních potkanů a potkanů po 3 měsících od expozice nízkým dávkám sarinu jsou znázorněny v grafech 1-3. Zatímco hladina KS v plazmě byla vůči kontrolním hodnotám signifikantně ($p < 0,05$) zvýšena pouze v případě expozice potkanů nadprahovou dávkou sarinu vyvolávající mírné známky intoxikace bezprostředně po expozici (graf 1), aktivita TAT v játrech byla statisticky významně ($p < 0,05$) zvýšena také u prahové dávky sarinu, ať už byla k expozici pokusných zvířat použita jednorázově, nebo opakovaně (graf 2). Na rozdíl od KS a TAT změny katecholaminů v mozku v případě 3měsíčního intervalu po expozici se týkaly především podprahové a jednorázově použité prahové dávky sarinu. U potkanů takto exponovaných došlo ke statisticky významnému ($p < 0,05$) zvýšení 5-HT (serotoninu), jeho metabolitu 5-HIAA a metabolitu dopaminu DOPAC. V případě použití nejvyšší, nadprahové dávky sarinu docházelo po 3 měsících od expozice k minimálním změnám všech sledovaných katecholaminů a jejich metabolitů (graf 3).

Ze sledování změn markerů stresu po 6 měsících od expozice pokusných zvířat nízkým dávkám sarinu vyplývá, že reakce sarinem exponovaných potkanů na stres se příliš neliší od reakce na stres u potkanů kontrolních, jak je ukázáno v grafech 1, 2 a 4. Zatímco hladina KS v plazmě ani aktivita TAT v játrech se u experimentálních potkanů od kontrolních hodnot signifikantně neliší bez ohledu na použitou dávku sarinu (graf 1, 2), v případě hladin katecholaminů v mozku dochází spíše k mírnému poklesu některých metabolitů jak dopaminu, tak

serotoninu (graf 4).

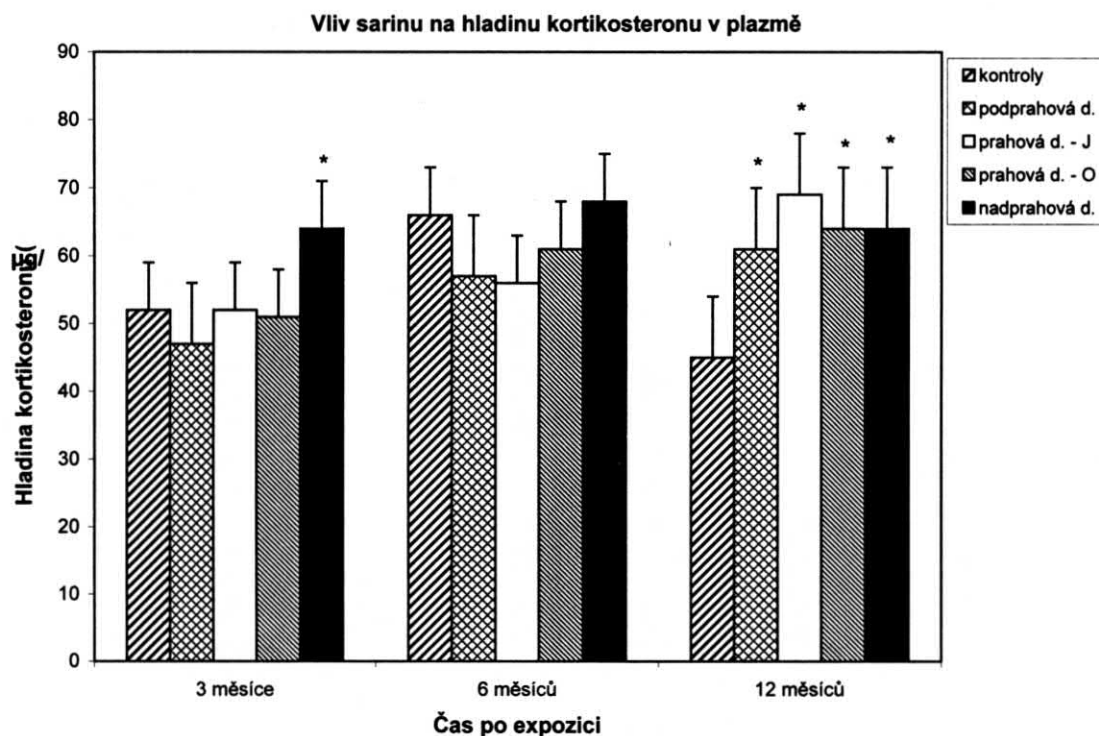
U potkanů, kteří byli exponováni nízkým dávkám sarinu před 12 měsíci, kupodivu dochází k poměrně významnému ovlivnění změn markerů stresu po uvedení do celkové éterové narkózy, jak je vidět v grafech 1, 2 a 5. Hladina KS v plazmě je oproti kontrolním hodnotám statisticky významně ($p < 0,05$) zvýšena u všech skupin experimentálních potkanů bez ohledu na výši použité dávky sarinu či počet expozic (graf 1). Aktivita TAT v játrech je proti tomu signifikantně ($p < 0,05$) zvýšena pouze u potkanů exponovaných opakovaně prahové dávce nebo jednorázově nadprahové dávce sarinu (graf 2). Také oba sledované katecholaminy v mozku, dopamin a serotonin, jsou statisticky významně zvýšeny ($p < 0,05$) prakticky u všech sledovaných dávek sarinu bez ohledu na počet expozic (graf 5).

Diskuse

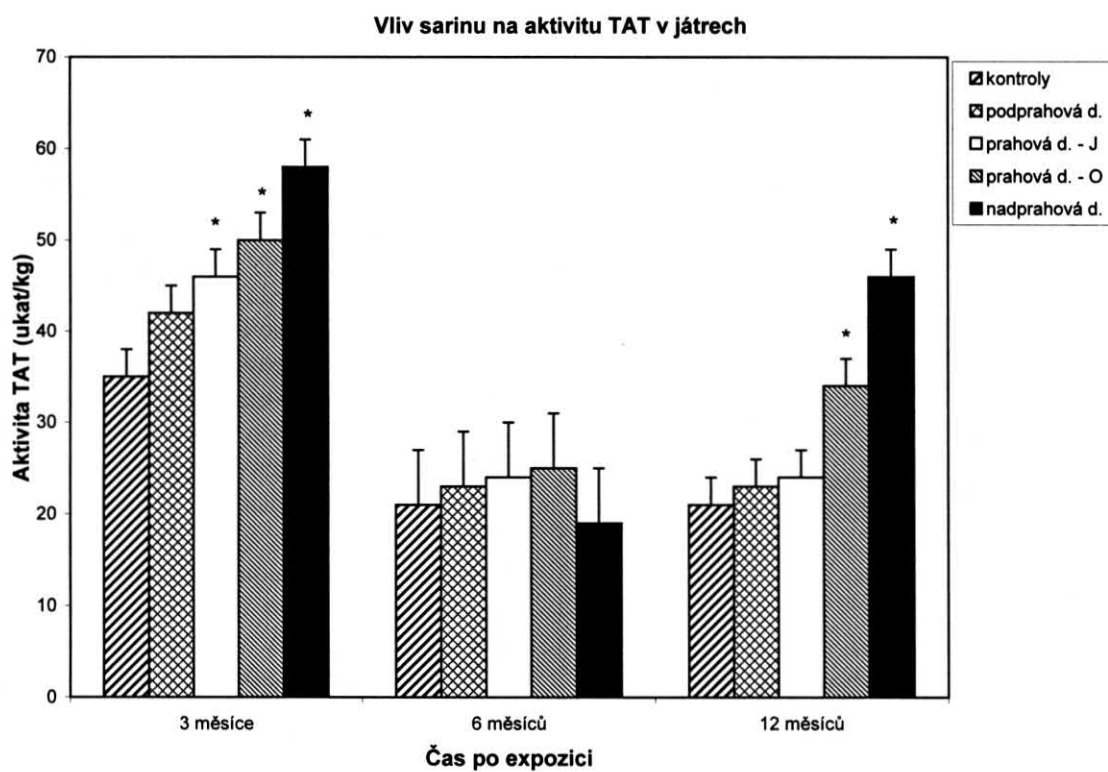
Opakovaně bylo prokázáno, že dávky OF sloučenin vyvolávající závažné klinické známky intoxikace vykazují také výrazné stresogenní působení projevující se rychlým a prudkým zvýšením hladiny KS v plazmě následovaným výrazným zvýšením aktivity TAT v játrech. Statisticky významné změny výše uvedených markerů stresu se objevují již po 40% poklesu aktivity krevních cholinesteráz (3, 11, 14). Tento stresogenní efekt se objevuje u otrav jak vysoce toxickými OF sloučeninami (12), tak organofosforovými insekticidy (10). Přitom změny aktivity enzymu TAT v játrech obvykle následují po rychleji proběhnutých změnách hladiny KS v plazmě z důvodu podílu TAT na realizaci metabolických účinků KS (2, 17).

Také statisticky významné zvýšení námi sledovaných katecholaminů či jejich metabolitů v mozku bylo v případě subletálních, klinicky závažných intoxikací OF sloučeninami opakovaně prokázáno. Vysoce toxické OF sloučeniny, konkrétně soman, vyvolávají v konvulzivní dávce statisticky významné zvýšení jak dopaminu (DA) a serotoninu (5-HT), tak jejich hlavních metabolitů (DOPAC, HVA, 5-HIAA). Předpokládá se, že by se tyto změny mohly v případě závažnějších intoxikací OF sloučeninami podílet na konvulzivním účinku těchto tox (5, 6, 18).

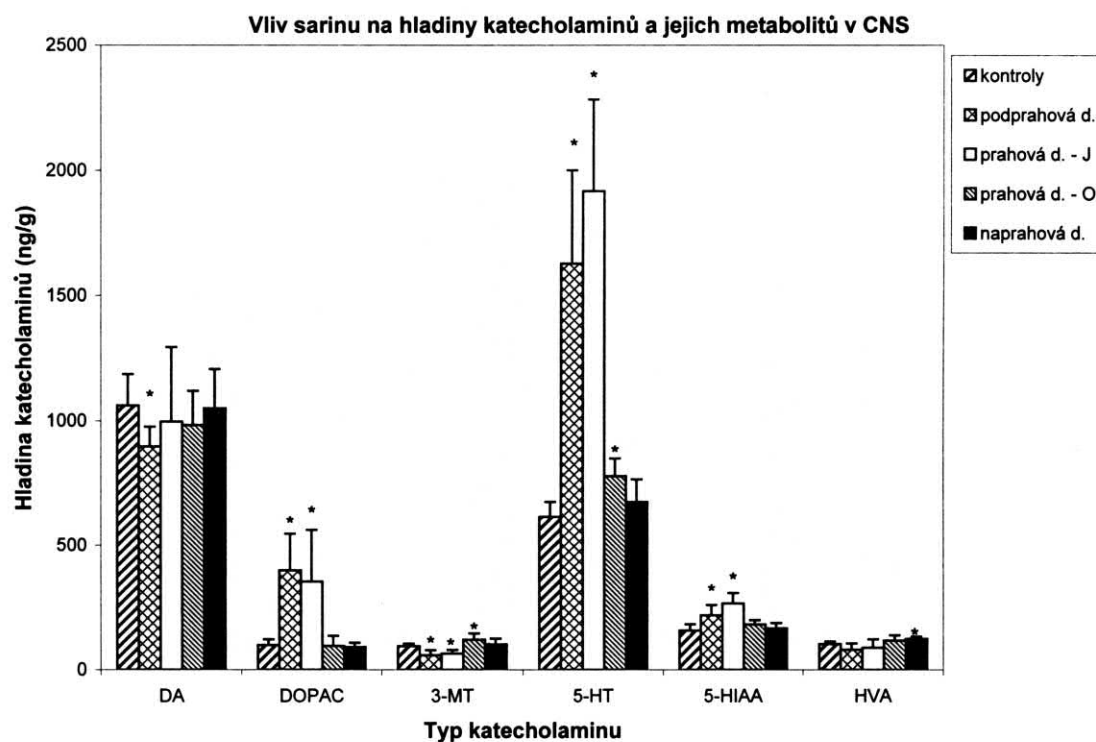
Na rozdíl od klinicky manifestních intoxikací OF sloučeninami je velmi málo známo o možných stresogenních účincích nízkých, klinicky asymptomatických dávek těchto tox. Naše výsledky proka-



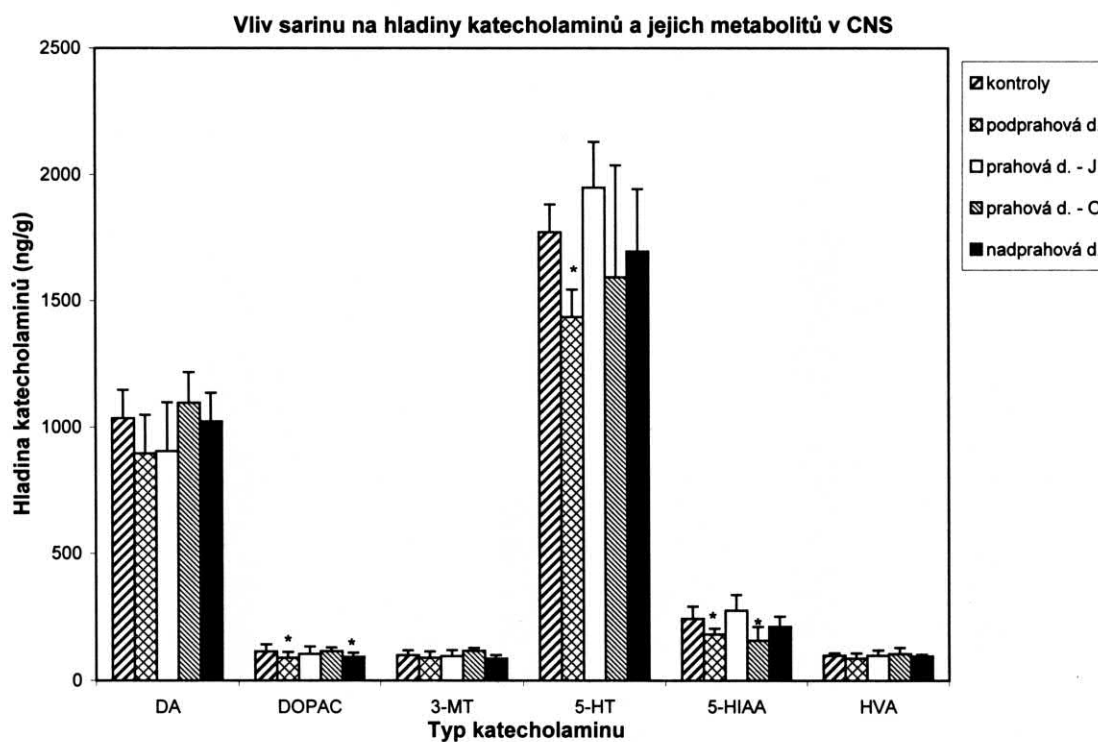
Graf 1: Změny hladiny kortikosteronu v plazmě po 3, 6 a 12 měsících od inhalační expozice potkanů nízkým dávkám sarinu. Statistická významnost: * $p < 0,05$



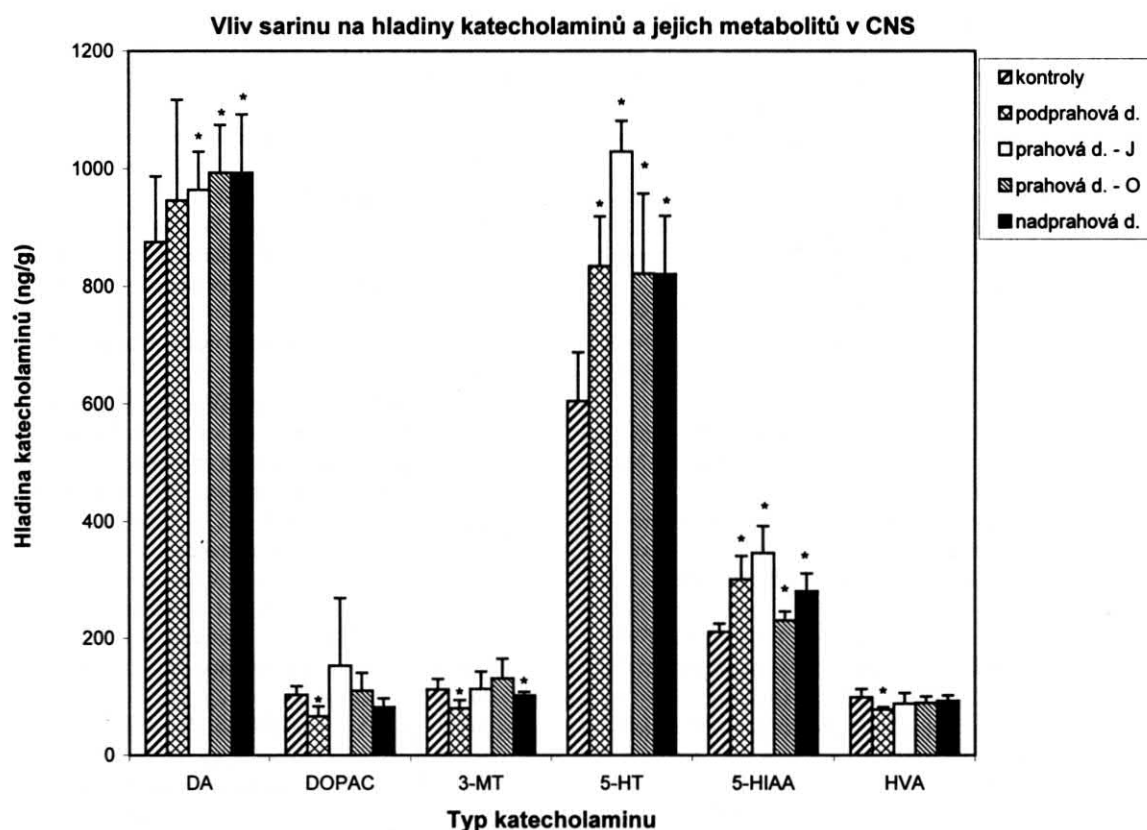
Graf 2: Změny aktivity tyrozin aminotransferázy v játrech po 3, 6 a 12 měsících od inhalační expozice potkanů nízkým dávkám sarinu. Statistická významnost: * $p < 0,05$



Graf 3: Změny hladiny katecholaminů a jejich metabolitů v mozku po 3 měsících od inhalační expozice potkanů nízkým dávkám sarinu, kde DA - dopamin, DOPAC - kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová, 3-MT - 3-methoxytyramin, 5-HT - 5-hydroxytryptamin (serotonin), 5-HIAA - kyselina 5-hydroxyindoloctová, HVA - kyselina homovanilínová. Statistická významnost: * $p < 0,05$



Graf 4: Změny hladiny katecholaminů a jejich metabolitů v mozku po 6 měsících od inhalační expozice nízkým dávkám sarinu. Symboly - viz graf 3. Statistická významnost: * $p < 0,05$



Graf 5: Změny hladin katecholaminů a jejich metabolitů v mozku po 12 měsících od inhalační expozice nízkým dávkám sarinu. Symboly - viz graf 3. Statistická významnost: * $p < 0,05$

zuji, že nejen velmi citlivé periferní markery stresu, jako jsou KS v plazmě a TAT v játrech, ale také katecholaminy v mozku, konkrétně dopamin a serotonin, jsou statisticky významným způsobem ovlivněny nejen po dávce sarinu vyvolávající mírné muskarinové příznaky otravy, ale i po klinicky asymptomatické dávce sarinu. Pozoruhodný je především fakt, že zvýšená citlivost ke stresu projevující se aktivací hypothalamo-hypofyzeo-adrenální osy i sympatoadrenálního systému je statisticky významným způsobem prokazatelná i po 12 měsících po expozici nízkým, klinicky asymptomatickým dávkám sarinu. Navíc byly prokázány statisticky významné změny hladin dopaminu a serotoninu v CNS, přestože cholinergní nervový systém není prakticky ovlivněn (aktivita AChE v CNS u sarinem exponovaných potkanů se signifikantně nelišila od kontrolních hodnot).

Ačkoli je velmi obtížné přímo extrapolovat tyto nálezy na člověka, je nesporné, že je třeba vzít v úvahu možnou vyšší citlivost ke stresogenním podnětům u člověka exponovaného nízkým dávkám jak

OF insekticidů, tak vysoce toxickým OF sloučeninám, zneužívaným jako NPL k válečným či teroristickým účelům, a to i po dlouhé době po expozici.

Poděkování

Autoři děkují paní E. Vodákové, J. Petrové, J. Uhlířové a I. Ježkové za technickou spolupráci a Mgr. V. Bláhovi za pomoc při statistickém zpracování výsledků.

Tato studie byla finančně podpořena grantem Ministerstva obrany ČR č. 66020397202.

Literatura

1. AFIFI, AA. - AZEN, SP.: Statistical analysis and computer oriented approach. 2nd ed. New York, Academic Press, 1979. 442 p.
2. ALEXANDROVÁ, M.: Stress induced tyrosine aminotransferase activity via glucocorticoid receptor. Horm. Metab. Res., 1994, vol. 26, p. 97-99.

3. BAJGAR, J.: Necholinergní účinky organofosfátů. Čas. Lék. čes., 1993, roč. 132, č. 17, s. 513-517.
 4. DIAMONDSTONE, TI.: Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydroxyphenylpyruvate to p-hydroxybenzaldehyde. Anal. Biochem., 1966, vol. 16, p. 395-401.
 5. EL-ETRI, MM., et al.: Brain norepinephrine reductions in soman intoxicated rats: association with convulsions and AChE inhibition, time course and relation to other monoamines. Exp Neurol., 1992, vol. 118, p. 153-163.
 6. FOSBRAEY, P. - WETHERELL, JR. - FRENCH, MC.: Neurotransmitter changes in guinea-pig brain regions following soman intoxication. J. Neurochem., 1990, vol. 54, p. 72-79.
 7. HALEY, RW., et al.: Evaluation of neurologic function in Gulf War veterans: a blinded case-control study. JAMA, 1997, vol. 277, p. 223-230.
 8. HALEY, RW. - KURT, TL.: Self-reported exposure to neurotoxic chemical combinations in the Gulf War: a cross-sectional epidemiologic study. JAMA, 1997, vol. 277, p. 231-237.
 9. HALEY, RW. - KURT, TL. - HOM, J.: Is there a Gulf War syndrome? - searching for syndromes by factor analysis of symptoms. JAMA, 1997, vol. 277, p. 215-222.
 10. KASSA, J.: Stresogenní účinek dichlorvosu. Prac. Lék., 1987, roč. 39, č. 9, s. 406-411.
 11. KASSA, J.: Stresogenní účinek organofosforových sloučenin. In *Inf. Zprav. VLA JEP Hradec Králové*, 1990, roč. 31, č. 3, s. 71-86.
 12. KASSA, J.: Stresogenní účinek dimethylaminoethyl-(dimethylamido) fluorofosfátu. Voj. zdrav. Listy, 1993, roč. 62, č. 3/4, s. 88-90.
 13. KASSA, J. - BAJGAR, J.: Cholinergní a necholinergní účinky organofosfátů. In *Sbor. věd. Prací VLA JEP Hradec Králové*, 1993, sv. 116, s. 29-49.
 14. KASSA, J.: Non-specific effects of organophosphorus inhibitors of cholinesterases. Voj. zdrav. Listy, 1998, vol. 67, Suppl. 2, p. 15-19.
 15. MARRS, TC.: Organophosphate poisoning. Pharmacol. Ther., 1993, vol. 58, p. 51-66.
 16. MATTINGLY, D.: A simple fluorimetric method for the estimation of free 1-deoxycorticoids in human plasma. J. Clin. Pathol., 1962, vol. 15, p. 374-379.
 17. NÉMETH, Š.: Inhibitory effects of immobilization stress on depression of liver tyrosine aminotransferase and tryptophane pyrrolase by glucose feeding in rats, Endocrin. Exp., 1977, vol. 11, p. 44-48.
 18. RETHMANN, C., et al.: Studies of the role of central catecholaminergic mechanisms in the antidotal effect of the oxime HI-6 in soman poisoned mice. Arch. Toxicol., 1988, vol. 62, p. 41-44.
 19. SCHREIBER, V.: Stres. 1. vyd. Praha, Avicenum 1985. 384 s.
 20. TAKEDA, H. - MATSUMIYA, T. - SHIBUYA, T.: Detection and identification modes for the highly sensitive and simultaneous determination of various biogenic amines by coulometric high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 1990, vol. 515, p. 265-278.
 21. WESTER, P., et al.: Simultaneous liquid chromatographic determination of seventeen of the major monoamine neurotransmitters, precursors and metabolites. I Optimization of the mobile phase using factorial designs and a computer program to predict chromatograms. J. Chromatogr., 1987, vol. 415, p. 261-274.
 22. WESTER, P. - GOTFRIDES, J. - WINBLAD, B.: Simultaneous liquid chromatographic determination of seventeen of the major monoamine neurotransmitters, precursors and metabolites. II Assessment of human brain and cerebrospinal fluid concentrations. J. Chromatogr., 1987, vol. 415, p. 275-288.
- Korespondence: Pplk. doc. MUDr. Jiří Kassa, CSc.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: kassa@pmfhk.cz
- Do redakce došlo 23. 11. 1999