

VLIV OPAKOVANÉ ANTIDOTNÍ TERAPIE NA TOXICITU TABUNU U MYŠÍ

Jiří KASSA

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

Souhrn

V pokusech na samcích myši kmene NMRI byl testován vliv jednorázově nebo opakovaně podané antidotní terapie různými oximy (pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, oxim HI-6) v kombinaci s anticholinergikem atropinem na akutní toxicitu organofosforové sloučeniny tabunu cestou ovlivnění střední smrtné dávky (LD_{50}) při 24hodinovém přežívání tabunem otrávených pokusných zvířat.

Pokud je některý z testovaných oximů v kombinaci atropinem podáván opakovaně v průběhu akutní intoxikace tabunem, dochází k mírnému, nesignifikantnímu vzestupu hodnoty LD_{50} oproti jednorázovému podání těžce antidotní kombinace pouze v případě použití pralidoximu nebo obidoximu jako reaktivátoru acetylcholinesterázy. To znamená, že opakované podání sledovaných kombinací antidot nevede ke statisticky významnému zlepšení efektu léčby u akutní intoxikace tabunem. Srovnání terapeutického efektu sledovaných oximů ukázalo, že trimedoxim se jeví jako nejvhodnější oxim ke snížení akutní toxicity tabunu.

Získané výsledky potvrdily, že ze současných reaktivátorů acetylcholinesterázy se ani jeden nejeví jako dostatečně účinný pro eliminaci akutní toxicity tabunu. Jako perspektivní reaktivátor acetylcholinesterázy se pro terapii akutních otrav tabunem nabízí trimedoxim. Opakované podání antidot v průběhu akutní intoxikace tabunem nevede k pronikavějšímu zlepšení efektu léčby.

Klíčová slova: Tabun; Pralidoxim; Obidoxim; Trimedoxim; HI-6; Atropin; LD_{50} ; Myš.

The Effect of Repeated Antidotal Treatment on Tabun-Induced Toxicity in Mice

Summary

Male NMRI mice were used to test the effect of single or repeated antidotal treatment with various oximes (pralidoxime, obidoxime, trimedoxime, the oxime HI-6) in combination with an anticholinergic drug atropine on the acute toxicity of organophosphorus tabun compound with the help of evaluating medial lethal (LD_{50}) dose at a 24-hour survival of tabun-poisoned experimental animals.

If some of the tested oximes in combination with atropine were administered repeatedly during acute tabun intoxication, a slight increase in the LD_{50} value was observed compared to a single administration when pralidoxime or obidoxime was used as an acetylcholinesterase reactivator. This means that the repeated administration of observed antidotal mixtures does not bring a significant improvement in the efficacy of antidotal treatment of acute tabun poisoning. The comparison of the therapeutic effects of tested oximes shows that trimedoxime seems to be the most suitable oxime for decreasing the acute tabun toxicity.

The results confirm that no currently used oxime is sufficiently effective for eliminating acute tabun toxicity. Trimedoxime appears to be a prospective acetylcholinesterase reactivator for the antidotal treatment of tabun poisoning. The repeated administration of antidotes during acute tabun poisoning does not show a significant increase in the therapeutical efficacy of antidotal treatment of acute tabun poisoning.

Key words: Tabun, Pralidoxime; Obidoxime; Trimedoxime; HI-6; Atropine; LD_{50} ; Mouse.

Úvod

Přestože tabun (ethyl N,N-dimethylfosforamidokyanát) patří mezi nejstarší nervově paralytické látky (NPL), antidotní terapie akutních otrav touto toxikou nebyla dosud uspokojivě vyřešena. Jednou z hlavních příčin obtížné terapie akutních otrav tabunem je zřejmě velmi nesnadná reaktivace tabunem inhibované acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) z důvodu přítomnosti volného elektronového páru

na amidickém dusíku, který zaplňuje elektronovou vakanci ve vazbě fosfor–enzym a tím ztěžuje působení nukleofilních činidel včetně oximů (2, 4, 8, 11).

Současná antidotní terapie akutních otrav NPL obvykle obsahuje anticholinergní látku (nejčastěji atropin) a reaktivátor AChE. Atropin působí jako antagonist acetylcholinu na muskarinových cholinergních receptorech a reaktivátory AChE neboli oximy obnovují svým nukleofilním účinkem aktivitu inhibované AChE (8, 12, 15). Bohužel ani jeden z

běžně používaných oximů v kombinaci s atropinem není vůči akutní toxicitě tabunu dostatečně účinný (3, 6, 11, 13). Jedním z důvodů relativně malé účinnosti antidotní terapie akutní otravy tabunem jsou pozdní účinky tabunu způsobující úmrtí otrávených pokusných zvířat po 12. hodině po otravě (12, 15).

Z tohoto důvodu jsme se pokusili zvýšit efekt antidotní terapie prodloužením přetrvávající terapeutické hladiny antidot v plazmě cestou opakovaného podávání zvolených kombinací antidot. Účinnost antidotní terapie akutní otravy tabunem byla hodnocena z hlediska její schopnosti zabránit letálním účinkům tabunu po dobu 24 hodin po jeho podání experimentálnímu zvířeti.

Materiál a metody

Jako pokusná zvířata byli použiti samci bílých myši kmene NMRI chovu Konárovice o hmotnosti 19–24 g. Myši byly krmeny standardní Larsenovou dietou a napájeny vodou ad libitum.

Vliv volby reaktivátoru AChE a počtu terapeutických zásahů na účinnost antidotní terapie akutní otravy tabunem byl hodnocen cestou sledování úmrtnosti experimentálních zvířat otrávených i. m. postupně se zvyšujícími dávkami tabunu a léčených i. m. předem zvolenými kombinacemi antidot (atropin v kombinaci s některým z testovaných oximů) za 1 min po intoxikaci při jednorázové antidotní terapii, za 1, 60 a 240 min po intoxikaci při opakované antidotní terapii. Atropin byl podáván vždy v dávce 21 mg/kg, zatímco reaktivátory AChE v ekvivalentní dávce odpovídající 2 % hodnoty jejich LD₅₀ (1).

Úmrtnost léčených experimentálních zvířat v průběhu 24 hodin byla srovnávána s úmrtností neléčených experimentálních zvířat a ze získaných údajů

byly počítány hodnoty LD₅₀ s 95% intervalem spolehlivosti (IS) probitovou metodou (14). Účinnost jednotlivých terapeutických antidotních směsí v závislosti na počtu podání byla vyjadřována poměrem mezi hodnotami LD₅₀ léčené a neléčené intoxikace (indexem účinnosti – IU A) nebo poměrem mezi hodnotami LD₅₀ jednorázově a opakovaně léčené intoxikace – IU B.

Výsledky

Hodnoty LD₅₀ neléčené a jednorázově či opakovaně léčené intoxikace tabunem jsou uvedeny v tabulce 1. Z nich vyplývá, že bez léčby se hodnota LD₅₀ tabunu při i. m. podání u myši pohybuje kolem 265 μg/kg. Jednorázové i. m. podání některého z testovaných oximů v kombinaci s atropinem 1 min po otravě signifikantně zvýšilo hodnotu LD₅₀ tabunu na 1,1 až 1,7násobek ($p < 0,05$). Přitom nejvyššího vzestupu hodnoty LD₅₀ tabunu bylo dosaženo v případě kombinace atropinu s trimedoximem (IU = 1,71 pro 24hodinové přežití tabunem intoxikovaných pokusných zvířat). Ukázalo se, že pralidoxim je statisticky významně méně účinný při snižování akutní toxicity tabunu než všechny ostatní testované oximy ($p < 0,05$). Naopak trimedoxim prokázal statisticky významnou nejvyšší účinnost při eliminaci letálních účinků tabunu ($p < 0,05$).

Pokud byla antidotní terapie podávána opakovaně (1, 60 a 240 min po intoxikaci), došlo pouze k mírnému, statisticky nevýznamnému vzestupu efektu léčby ve srovnání s jednorázovým podáním stejných kombinací antidot, a to pouze v případě použití méně účinných oximů, jako je pralidoxim a obidoxim. Pralidoxim byl vyhodnocen jako nejméně účinný a

Tabulka 1

Vliv jednorázové a opakované antidotní terapie na hodnotu střední smrtné dávky (LD₅₀) tabunu při 24hodinovém přežívání myši

Intoxikace	Terapie		LD ₅₀ (μg/kg) ± 95% IS	IU A	IU B
neléčená	-----	-----	267,2 (255,3–279,7)	-----	-----
léčená	atropin pralidoxim	jednorázová	297,4 (281,2–330,2)*	1,11	-----
		opakovaná	329,9 (321,4–338,6)*	1,23	1,11
	atropin obidoxim	jednorázová	393,4 (368,6–419,6)*	1,47	-----
		opakovaná	411,6 (388,5–436,0)*	1,54	1,05
	atropin trimedoxim	jednorázová	456,9 (421,2–495,0)*	1,71	-----
		opakovaná	419,4 (403,0–436,6)*	1,57	0,92
	atropin oxim HI-6	jednorázová	435,7 (410,9–461,9)*	1,63	-----
		opakovaná	397,9 (369,2–428,9)*	1,49	0,91

Pozn.: Údaje označené * vykazují statisticky významný rozdíl mezi neléčenou a léčenou intoxikací tabunem na hladině významnosti $p < 0,05$.

trimedoxim jako nejvíce účinný oxim pro eliminaci letálních účinků tabunu podobně jako v případě jednorázové antidotní terapie akutní intoxikace tabunem (tab. 1).

Diskuse

Dosažené výsledky naznačily, že akutní otravu tabunem nelze s dostatečnou účinností léčit pouze kombinací běžně používaného anticholinergika (atropinu) s některým ze současně dostupných oximů vzhledem k jejich nízké schopnosti reaktivovat tabunem inhibovanou AChE z důvodu přítomnosti volného elektronového páru na amidickém dusíku, který zaplňuje elektronovou vakanci ve vazbě fosfor–enzym a tím ztěžuje působení nukleofilních činidel včetně oximů (3, 6, 13). Jedním z faktorů ovlivňujících účinnost antidotní terapie akutní otravy tabunem je správný výběr oximu, neboť se ukázalo, že existují statisticky významné rozdíly mezi jejich schopností reaktivovat tabunem inhibovanou AChE a tím zabránit akutní toxicitě tabunu. Žádný ze současně používaných reaktivátorů AChE se nezdá být dostatečně účinným vůči akutní toxicitě tabunu (8, 9, 10). Jako perspektivní oxim pro terapii akutní otravy tabunem se jeví již dříve používaný a poté opuštěný reaktivátor AChE trimedoxim, který vykazuje *in vitro* stejně jako *in vivo* nejvyšší reaktivční účinnost vůči tabunem inhibované AChE (10).

Jeden z problémů omezené účinnosti oximu je poměrně krátká doba jejich biologické dostupnosti v organismu. Například při i. m. podání oximu HI-6 je terapeutická hladina v plazmě (4 µg/ml) dosažena během 5 min a udrží se přibližně 50–120 min (5, 7). Podobně atropin je po i. m. podání z poloviny absorbován během 7 min a eliminován během 52 min (16). Pro udržení terapeutické hladiny oximu a anticholinergika v plazmě za účelem zabránění pozdním toxickým účinkům tabunu je nutno podávat antidota buď v permanentní intravenózní infuzi, nebo opakovaně v i. m. injekcích (7). Získané výsledky však výraznější efekt opakované antidotní terapie neprokázaly. Efekt opakované terapie byl pouze nevýznamně vyšší ve srovnání s účinkem jednorázového podání antidot, a to pouze v případě méně účinných oximů. S rostoucí účinností oximu se efekt opakované antidotní terapie vůči jednorázově podané léčbě snižoval. To znamená, že prodloužení terapeutické hladiny oximu a anticholinergika samo

o sobě k dostatečnému efektu terapie nestačí.

Poděkování

Autor děkuje J. Uhlířové za technickou spolupráci a za pomoc při statistickém zpracování výsledků. Dále děkuje MO za finanční pomoc formou grantu číslo OBVLAJEP20032.

Literatura

1. BAJGAR, J., et al. Treatment and prophylaxis against nerve agent poisoning. *ASA Newslett.*, 1994, vol. 94, no. 4, p. 10–17.
2. CABAL, J. – BAJGAR, J. Tabun – návrat po padesáti letech. *Chem. Listy*, 1999, vol. 93, p. 27–31.
3. CLEMENT, JG., et al. Efficacy of a combination of acetylcholinesterase reactivators, HI-6 and obidoxime, against tabun and soman poisoning in mice. *Arch. Toxicol.*, 1987, vol. 61, p. 70–75.
4. ETO, M. Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry. Cleveland, CRC Press Inc., 1976, p. 142.
5. GÖRANSSON-NYBERG, A., et al. Pharmacokinetics of HI-6 and atropine in anaesthetized pigs after administration by a new autoinjector. *Biopharm. Drug Disp.*, 1995, vol. 16, p. 635–651.
6. JOKANOVIC, M., et al. Oxime-induced reactivation of acetylcholinesterase inhibited by phosphoramidates. *Toxicol. Lett.*, 1996, vol. 85, p. 35–39.
7. JOVANOVIĆ, D., et al. Pharmacokinetics of HI-6 oxime in patients with acute organophosphorus insecticide poisonings. *Vojnosanit. Pregl.*, 1993, vol. 50, no. 1, p. 27–31.
8. KASSA, J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 2002, vol. 40, no. 6, p. 803–816.
9. KASSA, J. – KREJČOVÁ, G. Neuroprotective effects of currently used antidotes in tabun-poisoned rats. *Pharmacol. Toxicol.*, 2003, vol. 92, no. 6, p. 258–264.
10. KASSA, J., et al. Farmakologická profylaxe a antidotní terapie akutní otravy tabunem. *Voj. zdrav. Listy*, 2004, roč. 73, č. 3, s. 107–115.
11. KOPLOVITZ, I., et al. Dose-response effects of atropine and HI-6 treatment of organophosphorus poisoning in guinea pigs. *Drug Chem. Toxicol.*, 1995, vol. 18, p. 119–136.
12. MARRS, TC. Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.*, 1993, vol. 58, p. 51–66.
13. PUU, G., et al. Reactivation of nerve agent inhibited acetylcholinesterases by HI-6 and obidoxime. *Biochem. Pharmacol.*, 1986, vol. 35, p. 1505–1510.
14. TALLARIDA, R. – MURRAY, R. Manual of pharmacological calculation with computer programs. New York, Springer-Verlag, 1987. 145 p.
15. TAYLOR, P. Anticholinesterase Agents. In Hardman, JG., Limbird, LE. (eds.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. New York, McGraw Hill, 1996, p. 161–176.
16. THIERMANN, H., et al. Pharmacokinetics of atropine after i. m. injection with newly developed dry/wet combination autoinjector containing HI-6 or HLö-7. *Arch. Toxicol.*, 1996, vol. 70, p. 293–299.

Korespondence: Plk. doc. MUDr. Jiří Kassa, CSc.

Katedra toxikologie

Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně

Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové

e-mail: kassa@pmfhk.cz

Do redakce došlo 5. 3. 2004