

SROVNÁNÍ NEUROPROTEKTIVNÍHO ÚČINKU NOVĚ SYNTETIZOVANÝCH OXIMŮ (K250, K251) A OXIMŮ ZAVEDENÝCH V AČR (OBIDOXIM, HI-6) NA TABUNEM INTOXIKOVANÝCH POTKANECH

¹Jiří KASSA, ¹Jana ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, ³Sandra TESAŘOVÁ, ¹Kamil MUSÍLEK, ²Kamil KUČA, ¹Jiří BAJGAR

¹Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, katedra toxikologie, Hradec Králové

²Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Centrum pokročilých studií, Hradec Králové

³Sedmá polní nemocnice Armády České republiky, Hradec Králové

Souhrn

Na samcích potkana kmene Wistar byl testován neuroprotektivní účinek nově syntetizovaných oximů (K250, K251) a srovnáván s efektem oximů zavedených do zdravotnické výbavy AČR jako antidotum první pomoci (obidoxim) nebo lékařské pomoci (HI-6). Schopnost oximů eliminovat tabunem navozené akutní příznaky neurotoxicity byla hodnocena pomocí funkční pozorovací baterie 24 hodin po otravě tabunem. Získané výsledky ukázaly, že neuroprotektivní účinek nově syntetizovaného oximu K251 je o něco vyšší než účinek obidoximu a oximu HI-6, ale rozdíl v neuroprotektivní účinnosti výše uvedených oximů nebyl příliš výrazný. Oxim K250 je naopak méně účinný při eliminaci tabunem vyvolaných příznaků akutní neurotoxicity ve srovnání s obidoximem i oximem HI-6.

Klíčová slova: Tabun; Funkční pozorovací baterie; HI-6; Obidoxim; K250; K251; Atropin; Potkan.

A Comparison of the Neuroprotective Efficacy of Newly Synthesized Oximes (K250, K251) and Oximes Introduced into the Czech Army (Obidoxime, HI-6) in Tabun-Poisoned Rats

Summary

The neuroprotective efficacy of newly synthesized oximes (K250, K251) and the oximes introduced into the Czech Army for the first aid (obidoxime) and medical aid (HI-6) was compared in male Wistar rats. The potency of oximes to eliminate tabun-induced acute neurotoxic effects was evaluated with the help of a functional observational battery 24 hours following tabun intoxication. The obtained results demonstrate that the neuroprotective efficacy of newly synthesized oxime K251 is a little higher in comparison with the potency of obidoxime and HI-6 to eliminate tabun-induced acute neurotoxicity but the difference is not too high. On the contrary, another newly synthesized oxime K250 is less effective than obidoxime and HI-6 in elimination of tabun-induced acute neurotoxic effects.

Key words: Tabun; Functional observational battery; HI-6; Obidoxime; K250; K251; Atropine; Rat.

Úvod

Nervově paralytické látky (NPL) představují pro člověka stále relativně vysoké nebezpečí zejména z důvodu rizika zneužití těchto vysoce toxických látek pro válečné či teroristické cíle. Jejich toxický účinek spočívá především v ireverzibilní inhibici enzymu acetylcholinesterasy (AChE, EC 3.1.1.7) a následné akumulaci neuromediátoru acetylcholinu na periferních i centrálních receptorech cholinergního nervového systému (14, 20). Antidotní terapie akutních intoxikací NPL spočívá především v co nejrychlejším podání anticholinergní látky antagonisty účinek nahromaděného acetylcholinu na cholinergních receptorech a reaktivátoru AChE obnovujícího aktivitu inhibované AChE (6, 11).

Tabun (O-ethyl-N,N-dimethyl amidokyanofosfát patří mezi nejnebezpečnější NPL z důvodu obtížného terapeutického zásahu do mechanismu jeho toxického účinku. Příčinou obtížné léčitelnosti akutních otrav tabunem je pravděpodobně existence volného elektronového páru na amidové skupině, jež výrazně ztěžuje nukleofilní zásah oximů, a konformační změny v aktivním centru AChE po navázání tabunu (2, 7, 9).

Intoxikace tabunem může vyvolat centrálně zprostředkovanou záchvatovitou aktivitu, která rychle progreduje v generalizované toxicko-klonické křeče a může přispět k poškození mozku. Proto je schopnost antidot blokovat akutní neurotoxicke účinky tabunu, a tak zabránit vývoji ireverzibilních změn v centrálním nervovém systému (CNS), velmi důle-

žitá pro úspěšnost antidotní terapie. Obecně reaktivátory AChE, zvané podle své chemické struktury oximy, vykazují vyšší účinnost v periferním kompartmentu ve srovnání s centrálním kompartmentem z důvodu jejich obtížného průchodu přes hemato-encefalickou bariéru. Nicméně schopnost oximů proniknout do CNS přes hemato-encefalickou bariéru s následnou reaktivací inhibované AChE byla experimentálně prokázána (4, 18). Ačkoli míra reaktivace inhibované AChE v mozku je nižší ve srovnání s periferním nervovým systémem, je schopnost oximů reaktivovat inhibovanou AChE v CNS důležitá pro přežití a prognózu jedinců exponovaných NPL (11, 14).

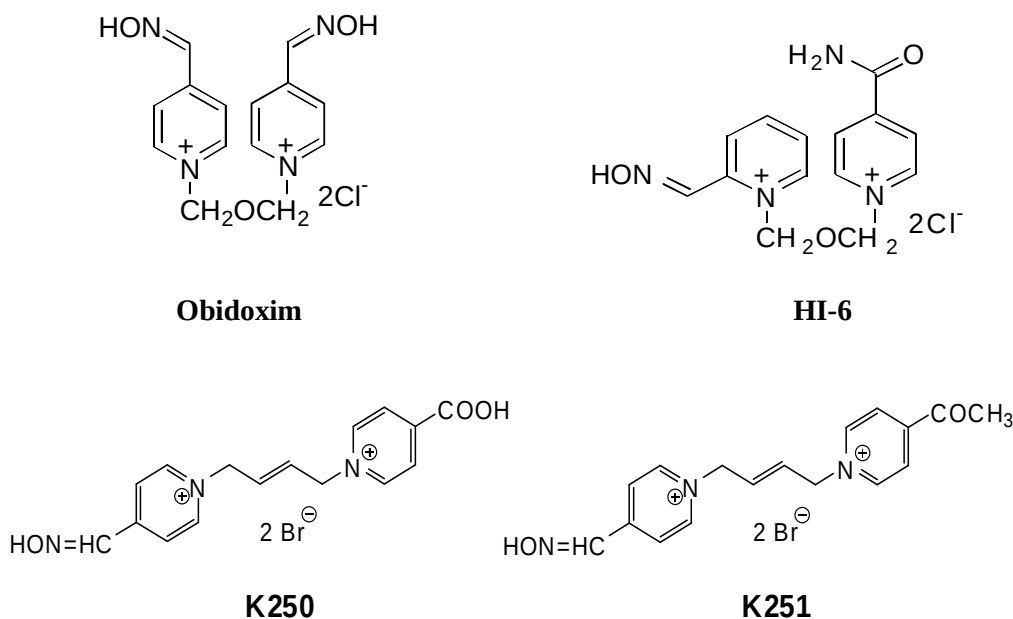
Obecně běžně používané reaktivátory fosforylované či fosfonylované AChE – monopyridiniové a bispyridiniové oximy – vykazují minimální účinnost při eliminaci akutních toxických účinků tabunu z důvodu velmi nízké reaktivační účinnosti (11). Poslední zavedený reaktivátor AChE do AČR – oxim HI-6, je sice účinnější při terapii akutních otrav somanem než ostatní běžně používané oximy (10, 17), ale jeho účinnost vůči tabunu je velmi nízká (5, 21). Z tohoto důvodu je pátrání po novém reaktivátoru AChE dostatečně účinném proti tabunu dlouhodobým cílem řady výzkumných pracovišť na celém světě. V minulém roce byly na naší katedře syntetizovány dva nové bispyridiniové oximy: K250 (E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-en dibromid, K251 (E)-1-

-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-methylcarbonylpyridinium)-but-2-en dibromid (obr. 1) za účelem zvýšení účinnosti antidotní terapie akutních otrav tabunem, včetně eliminace akutních neurotoxických příznaků (16).

Cílem této studie bylo srovnání schopnosti nově syntetizovaných oximů (K250, K251) a oximů zavedených v AČR (obidoxim, HI-6) eliminovat či alespoň redukovat tabunem vyvolanou akutní neurotoxicitu. Tabunem vyvolané akutní neurotoxické příznaky byly hodnoceny pomocí funkční pozorovací baterie, neinvazivního a poměrně citlivého typu hodnocení široké škály neurobiologických funkcí včetně senzorických, motorických a autonomních nervových funkcí.

Materiál a metody

Jako pokusná zvířata byli použiti samci bílých potkanů kmene WISTAR chovu VELAZ Praha o hmotnosti 200–220 g. Potkani byli krmeni standardní Larsenovou dietou a vodou *ad libitum*. Kontrolní i experimentální zvířata byla rozdělena do skupin po 8 zvířatech. Pokusy prováděné na těchto zvířatech byly schváleny Etickou komisí FVZ UO v Hradci Králové. Tabun o čistotě 95 % byl získán z VTÚO Brno. Jeho čistota byla hodnocena acidimetrickou titrací. Všechny oximy byly syntetizovány na katedře toxikologie FVZ UO v Hradci Králové.



Obr. 1: Chemická struktura oximů

Jejich čistota byla analyzována pomocí HPLC. Ostatní chemikálie analytické čistoty byly zakoupeny komerční cestou a použity bez dalšího čištění. Všechny látky byly potkanům podávány intramuskulárně (i. m.) v objemu 0,1 ml/kg hmotnosti.

Schopnost obou nově vyvinutých oximů K250 a K251 i oximů zavedených v AČR eliminovat tabunem vyvolané projevy neurotoxicity byla hodnocena na potkanech pomocí funkční pozorovací baterie, která představuje komplexní vyšetření stavu senzitivního, motorického i autonomního nervového systému experimentálních zvířat pomocí hodnocení více než 40 různých parametrů, z nichž některé jsou škálovány (tab. 1), jiné měřeny v absolutních hodnotách (8). Neuroprotektivní účinnost v AČR zavedených oximů (obidoxim, HI-6) a nově syntetizovaných oximů (K250 a K251) byla měřena 24 h po intoxikaci potkanů tabunem v dávce odpovídající 80 % hodnoty LD₅₀ tabunu. Účinek oximů podávaných i. m. v ekvimolární dávce 50 μmol/kg společně s atropinem (v dávce 21 mg/kg) za 1 min po i. m. otravě potkanů tabunem byl hodnocen stejně jako neurotoxicita tabunu za 24 h po otravě potkanů tabunem. Hodnoty jednotlivých parametrů tabunem vyvolané neurotoxicity u experimentálních zvířat byly statisticky srovnávány s hodnotami získanými od kontrolních zvířat, kterým byl místo tabunu a antidot podáván fyziologický roztok ve stejném objemu (0,1 ml/100 g hmotnosti). Statistické hodnocení získaných výsledků bylo prováděno pomocí analýzy rozptylu s následným hodnocením kontrastů metodou Scheffeho na 95% hladině významnosti ($p < 0,05$) (19).

Výsledky

Výsledky ovlivnění tabunem vyvolaných projevů neurotoxicity vybranými oximy v kombinaci s atropinem za 24 hodin po podání tabunu byly rozděleny do 3 částí (aktivita a neuromuskulární koordinace, sensorimotorické funkce a excitabilita a konečně autonomní funkce) a jsou uvedeny v tabulkách 2a až 2c (15). Tabunem bylo ovlivněno celkem 19 měřených parametrů nervových funkcí, včetně polohy, obtížnosti odchyty a manipulace, miózy a vymizení reakce zornice na světlo, snížení svalového napětí, snížení explorativní aktivity, zmenšení šíře stopy po dopadu, snížení síly svalové všech končetin, příjmu potravy, tělesné teploty a spontánní vertikální i horizontální motorické aktivity.

Zatímco oxim K250 nebyl schopen eliminovat

tabunem vyvolané příznaky akutní neurotoxicity výrazněji než obidoxim a oxim HI-6, druhý testovaný nově syntetizovaný oxim K251 vykázal vyšší počet eliminovaných tabunem vyvolaných příznaků neurotoxicity ve srovnání s obidoximem nebo oximem HI-6, i když rozdíly mezi neuroprotektivním účinkem tohoto oximu a obidoximu či oximu HI-6 nebyly nijak výrazné. U potkanů léčených oximem K251 přetrvávala mióza, snížení síly hrudních i pánevních končetin, příjmu potravin a spontánní vertikální a horizontální motorické aktivity. U potkanů léčených oximem K250 navíc přetrvávala změna polohy a obtížnosti odchyty a manipulace, snížení svalového napětí, explorativní aktivity a šíře stopy po dopadu (tab. 2a až 2c).

Diskuse

NPL včetně tabunu způsobují centrálně zprostředkované záchvaty, které rychle progredují do generalizovaných tonicko-klonických křečí a přispívají k poškození některých mozkových struktur. Dlouhodobá hyperstimulace muskarinových receptorů v mozku způsobená NPL je zřejmě spojena se zvýšením glutamatergní aktivity vedoucí k excitotoxickému poškození mozku, především v oblasti hipokampu, amygdal a piriformní kůry. Expozice experimentálních zvířat nervově paralytickým látkám v dávkách způsobujících křeče tak může vést k ireverzibilnímu poškození mozku, které se projeví ve formě neurobehaviorálních příznaků intoxikace (1). Proto schopnost antidot eliminovat akutní neurotoxické účinky NPL, a tak ochránit otrávené jedince před ireverzibilním poškozením CNS je velmi důležitá pro úspěšnost antidotní terapie akutních intoxikací NPL.

Získané výsledky prokázaly, že neuroprotektivní účinnost nově syntetizovaného oximu K250 je výrazně nižší ve srovnání s neuroprotektivními účinky druhého nově syntetizovaného oximu K251, jehož schopnost eliminovat tabunem vyvolané příznaky neurotoxicity je srovnatelná s neuroprotektivní účinností obidoximu, jenž je považován spolu s trimedoximem za nejúčinnější reaktivátor tabunem inhibované AChE mezi dosud používanými oximy (11). Ukazuje se, že významným faktorem ovlivňujícím neuroprotektivní, reaktivační a terapeutickou účinnost oximů vůči NPL, je jejich chemická struktura.

Mezi nejvýznamnější strukturální faktory ovlivňující neuroprotektivní, reaktivační a terapeutickou účinnost oximů je počet metylenových skupin v ře-

Tabulka 1

Funkční pozorovací baterie

PARAMETR	POUZE VELIČINY ORDINÁLNÍ A NOMINÁLNÍ									
	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7
Poloha v kleci				sedí/stojí	explor. aktivita	spí/leží	atonie	boční poloha	příkrčený	pokles hlavy
Obtížnost odchytu				pasivní	normální	zvýšená reakce	pohyb	útěk	agrese	
Obtížnost manipulace				pasivní	normální	silná reakce	vysoká reakce			
Svalový tonus	atonie	hypotonie	normální	hypertonie	rigidita	fasciculace				
Slzení			normální	mírné	silné	krusty	krusty zbarvené			
Postavení víček				otevřená	mírně přivřená	zpola přivřená	zavřená	ptóza		
Endo-exoftalmus		endo	normální	exo						
Srst			normální	zbarvená	rozcuchaná	zbarvená + rozcuchaná	lysina	poranění	jiné změny	piloerекce
Kůže			normální	bledá	zarudlá	cyanotická	pigmentace	studená	poraněná	
Salivace			normální	mírná	silná					
Nosní sekrece			normální	mírný	silný	zbarvený				
Tremor			žádný	při stimulaci	lokální	celkový	ovliv. pohyb	silný		
Klonické jevy			žádné	záškuby	nerytm. pohyb	slabý třes	silný třes	myoklonie	křeč	otřepávání
Tonické jevy			žádné	ext. rigidita	opistotonus	emprostotonus	prudké skoky	křeč		
Chůze			normální	ataxie	postižení pánevních končetin	protrace	postižení hrudních končetin	chůze po špičkách	shrbená chůze	vlačí tělo
Skóre postižení chůze				žádné	mírně abnormální	zřetelně abnormální	značně abnormální			
Ataxie				žádná	mírná	silná				
Skóre pohyblivosti				normální	mírně snižená	zřetelně snižená	zcela nepohyblivá			
Aktivita				velmi nízká	občasná	snížená	normální	zvýšená	trvalá	
Tenze			žádná	místní (uši)	stupor					
Stereotypie			žádná	hlava	trup	čištění	běh	jiné		
Bizarní chování			žádné	hlava	trup	automutilace	abnormální pohyb	jiné		
Reakce na přiblížení				žádná	normální	zvýšená	energická	prudká		
Reakce na dotyk				žádná	normální	zvýšená	energická	prudká		

těžci spojujícím oba pyridiniové kruhy, poloha funkční oximové skupiny na pyridiniovém kruhu a struktura dalšího substituentu na druhém pyridiniovém kruhu. Pro reaktivaci tabunem inhibované AChE jsou nejvýhodnější tři až čtyři metylenové skupiny ve spojovacím můstku mezi oběma pyridiniovými kruhy a jedna až dvě oximové skupiny v poloze čtyři na pyridiniovém kruhu (3, 13). Rozdíl mezi neuroprotektivní účinností obou nově syntetizovaných oximů je zřejmě způsoben rozdílnou chemickou strukturou substituentu na druhém pyridiniovém kruhu, jež mimo jiné ovlivnila i toxicitu obou oximů a jejich reaktivací a terapeutickou účinnost vůči tabunu (12).

Závěrem lze konstatovat, že neuroprotektivní účinek nově syntetizovaného oximu K251 je mírně vyšší ve srovnání s obidoximem, přestože jeho reaktivací a terapeutický efekt nedosahuje účinku obidoximu (12). Rozdíl v neuroprotektivní účinnosti mezi oximem K251 a obidoximem však není natolik výrazný, aby se stal podnětem k zavedení oximu K251 pro terapii otrav tabunem místo v současnosti používaných oximů, především obidoximu a trimedoximu.

Poděkování

Autoři děkují E. Reslové a J. Uhlířové za technickou spolupráci. Práce byla finančně podpořena účelovými prostředky Výzkumného záměru MO0FVZ0000501.

Literatura

- BAJGAR, J. Organophosphate/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Adv. Clin. Chem.*, 1996, vol. 38, p. 151–216.
- CABAL, J. – BAJGAR, J. Tabun – návrat po padesáti letech. *Chem. Listy*, 1999, roč. 93, s. 27–31.
- CABAL, J. – KUČA, K. – KASSA, J. Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun inhibited acetylcholinesterase. *Pharmacol. Toxicol.*, 2004, vol. 95, p. 81–86.
- CASSEL, G. – KARLSSON, L. – WAARA, L., et al. Pharmacokinetics and effects of HI-6 in blood and brain of soman-intoxicated rats: a microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, vol. 332, p. 43–52.
- CLEMENT, JG. – SHILOFF, JD. – GENNINGS, C. Efficacy of a combination of acetylcholinesterase reactivators, HI-6 and obidoxime, against tabun and soman poisoning of mice. *Arch. Toxicol.*, 1987, vol. 61, p. 70–75.
- DAWSON, RM. Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *J. Appl. Toxicol.*, 1994, vol. 14, p. 317–331.
- EKSTRÖM, F. – AKFUR, C. – TUNEMALM, AK., et al. Structural changes of phenylalanine 338 and histidine 447 revealed by the crystal structures of tabun-inhibited murine acetylcholinesterase. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, p. 74–81.
- FRANTIK, E. – HORNYCHOVA, M. Clustering of neurobehavioral measures of toxicity. *Homeostasis*, 1995, vol. 36, p. 19–25.
- JOKANOVIC, M. – MAKSIMOVIC, M. – KILIBARDA, V., et al. Oxime-induced reactivation of acetylcholinesterase inhibited by phosphoramidates. *Toxicol. Lett.*, 1996, vol. 85, no. 1, p. 35–39.
- KASSA, J. Comparison of two oximes (HI-6 and obidoxime) in soman poisoning in rats. *Toxicology*, 1995, vol. 101, p. 167–174.
- KASSA, J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 2002, vol. 40, p. 803–816.
- KASSA, J. – KARASOVA, J. – BAJGAR, J., et al. A comparison of the reactivating and therapeutic efficacy of newly developed bispyridinium oximes (K250, K251) with commonly used oximes against tabun in rats and mice. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, 2009, vol. 24, p. 1040–1044.
- KUCA, K. – JUN, D. – MUSILEK, K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2006, vol. 6, p. 269–277.
- MARRS, TC. Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.*, 1993, vol. 58, p. 51–66.
- MOSER, VC. – TILSON, H. – MCPHAIL, RC., et al. The IPCS collaborative study on neurobehavioral screening methods: II. Protocol design and testing procedures. *Neurotoxicology*, 1997, vol. 18, p. 929–938.
- MUSILEK, K. – HOLAS, O. – JUN, D., et al. Mono-oxime reactivators of acetylcholinesterase with (E)-but-2-ene linker – Preparation and reactivation of tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, vol. 15, p. 6733–6741.
- ROUSSEAU, CG. – DUA, AK. Pharmacology of HI-6, an H series oxime. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1989, vol. 67, p. 1183–1189.
- SAKURADA, K. – MATSUBARA, K. – SHIMIZU, K., et al. Pralidoxime iodide (2-PAM) penetrates across the blood-brain barrier. *Neurochem. Res.*, 2003, vol. 28, p. 1401–1407.
- TALLARIDA, R. – MURRAY, R. Manual of Pharmacological Calculation with Computer Programs. Springer-Verlag, New York, 1987. 145 p.
- 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.
- WOREK, F. – WIDMANN, R. – KNOPFF, O., et al. Reactivation potency of obidoxime, pralidoxime, HI-6 and HLö-7 in human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by highly toxic organophosphorus compounds. *Arch. Toxicol.*, 1998, vol. 72, no. 4, p. 237–243.

Korespondence: Plk. prof. MUDr. Jiří Kassa, CSc.
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Katedra toxikologie
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: kassa@pmfhk.cz

Do redakce došlo 31. 3. 2009