

JE FLUORACE OXIMŮ TOUTO SPRÁVNOU CESTOU K ZVÝŠENÍ PRŮNIKU TĚCHTO LÁTEK DO CENTRÁLNÍHO NERVOVÉHO SYSTÉMU?

¹Jana ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, ¹Jiří KASSA, ¹Kamil MUSÍLEK, ³Young-Sik JUNG, ²Kamil KUČA

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

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

³Korea Research Institute of Chemical Technology, Medicinal Science Division, Daejeon, Korea

Souhrn

Přestup reaktivátorů acetylcholinesterasy přes hematoencefalickou bariéru je v současnosti jedním z často debatovaných problémů souvisejících s účinností těchto terapeutik. Zvýšení lipofility se jeví jako jedna z možných cest, které by mohly zvýšit průnik těchto látek do mozku.

V této práci je hodnocena reaktivační účinnost nově připraveného oximu – fluorovaného reaktivátoru K203, který byl připraven na spolupracujícím pracovišti Research Institute of Chemical Technology (Korea) a nese označení K22836. Fluorace oximu K203 však vedla k snížení jeho terapeutické účinnosti, která se projevila jak snížením reaktivace acetylcholinesterasy v krvi, tak i v centrálním nervovém systému. Nejlépe působícím reaktivátorem vůči tabunem inhibované acetylcholinesterase tak i nadále zůstává původní, námi připravený oxim K203.

Klíčová slova: Reaktivátor; AChE; K203; K22836; CNS.

Is Oxime Fluorination the Proper Way to Increase Penetration of These Compounds in the Central Nervous System?

Summary

The penetration of acetylcholinesterase (AChE) reactivators through the blood-brain barrier is hotly discussed question nowadays. The increase of lipophilicity of these compounds is one of the possible ways how to increase their penetration and also their efficacy in the central nervous system.

The aim of this study is to compare the reactivation potency of newly synthesized oxime – oxime K203 – after its fluorination. This AChE reactivator was prepared at the Research Institute of Chemical Technology (Korea) and is known as K22836. The fluorination of oxime K203 leads to reduction of its therapeutic efficacy. The reactivation potency of newly synthesized oxime K22836 was lower in the whole blood and also in the central nervous system. In summary, the most efficacious reactivator in case of tabun-inhibited AChE is still oxime K203 originally prepared at our department.

Key words: Reactivator; AChE; K203; K22836; CNS.

Úvod

Terapie intoxikací organofosforovými inhibitory (OFI) není dosud uspokojivě vyřešena i přestože je hlavní mechanismus účinku znám. Je jím inhibice životně důležitého enzymu acetylcholinesterasy (AChE, EC 3.1.1.7) (1). V současnosti je doporučováno podání kombinace atropinu a reaktivátoru (2). Atropin blokuje muskarinové receptory, čímž snižuje účinky kumulovaného neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) v synapsích vegetativního nervového systému a v orgánech. Neřeší však příčinu intoxikace, navýšení hladiny ACh. K tomuto účelu byla vyvinuta jiná terapeutická skupina, označova-

ná jako reaktivátory AChE oximového typu. Tyto reaktivátory znovuobnovují aktivitu inhibované AChE, ta pak začne znovu štěpit ACh a tím sníží jeho hladinu na fyziologickou mez (3).

V terapii intoxikace tabunem je standardním reaktivátorem obidoxim, který je zaveden v antidotní výbavě mnoha armád (4). Tato terapie však není dostatečně účinná, proto jsou na katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví UO vyvíjeny nové typy reaktivátorů. Nejlepší, který byl pro terapii intoxikace způsobené tabunem vyvinut, je označován jako K203 (5) a je testován na mnoha kooperujících zahraničních pracovištích jako potenciální nástupce standardního reaktivátoru obidoximu.

cystein chloridu je připraven rozpuštěním přesného množství této látky (0,03152 g) v 200 ml destilované vody. Zásobní roztok je rozdělen na dávky po 1 ml do mikrozkušavek a je skladován při teplotě $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby, kdy je použit ke kalibraci.

Zvířata

Samci potkanů kmene Wistar o hmotnosti 180 až 200 g (BioTest; Konarovice, ČR). Zvířata byla ustáje-na v klimatizované místnosti (stálá teplota $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, vlhkost $50 \pm 10\%$, světelný cyklus 12 h světlo/tma), krmena byla standardní peletovou dietou a vodou *ad libitum*. Experiment byl pod dohledem Etické komise Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany (Hradec Králové).

In vivo experiment

Atropin v terapeutické dávce (21 mg/kg) byl i. m. aplikován v kombinaci s reaktivátorem (obidoxim, K203, K22836) 5 minut před vlastní intoxikací tabunem. Otravné látky v dávkách odpovídajících 1 LD₅₀ byly aplikovány do svalu pravého zadního stehna zvířete. Kontrolní skupině byl podán atropin v terapeutické dávce a za 5 min byl i. m. aplikován fyziologický roztok.

Zvířata byla usmrcena dekapitací 30 min po intoxikaci nervově paralytickou látkou, jako anestézie byl použit CO₂. Po dekapitaci byla odebrána hrde-lní krev do zkumavek s heparinem a mozek.

Biochemické stanovení

Biochemické stanovení aktivity cholinesteras bylo provedeno ihned po náběru plné krve. Krev byla nej-prve hemolyzována v 0,02 M Tris-pufu (pH 7,6) v poměru 1:20 (plná krev/puf) po dobu 5 minut. Hemolyzát byl poté využit pro stanovení aktivit krev-ních cholinesteras. Do kyvety byl napipetován roz-tok DTNB v 0,1 M Tris-pufu o pH 7,6 (1,7 ml), pak byla přidána hemolyzovaná krev (0,1 ml)/plazma (0,1 ml) a reakce byla odstartována přidáním sub-strátu specifického pro AChE, ATCh (0,2 ml).

Pro stanovení aktivity cholinesteras v mozkové tkáni byl připraven z odebraného mozku homoge-nát s 0,02 M Tris-pufu (pH 7,6) v poměru 1:10 (mozek/puf). Homogenát byl poté užít pro stanove-ní cholinesteras stejně, jak bylo popsáno výše u he-molyzované krve.

Aktivita cholinesteras byla měřena standardní spektrofotometrickou metodikou podle Ellmana, by-la modifikována vlnová délka na 436 nm, tak aby nedocházelo k výrazným interferencím s hemoglobi-nem. Pro stanovení absorbance byl použit Spektro-

fotometr Helios Alpha (Elektron Corporation, Oxford, Velká Británie). Výsledky byly vyhodnoceny v jed-notkách $\mu\text{kat/ml}$.

Kalibrace

Před vlastní kalibrací je připravena cysteinová koncentrační řada. Základní roztok cystein chloridu je ředěn vždy v poměru 1:1 (koncentrovanější roz-tok cystein chloridu/destilovaná voda). Takto vznikne řada o čtyřech různých koncentracích, přičemž zá-kladní roztok je 0,2 μM .

Kalibrační řada:

0,2 μM $\rightarrow$ 0,1 μM $\rightarrow$ 0,05 μM $\rightarrow$ 0,025 μM

Pro kalibraci se do kyvety místo krevního he-molyzátu napipetuje stejný objem (0,1 ml) roztoku cystein chloridu z připravené kalibrační řady. Přidá se roztok DTNB v pufru a reakce se odstartuje při-dáním příslušného substrátu (ATCh). Měří se proti slepě připravenému vzorku, v něm je hemolyzát (roz-tok cystein chloridu) nahrazen destilovanou vodou.

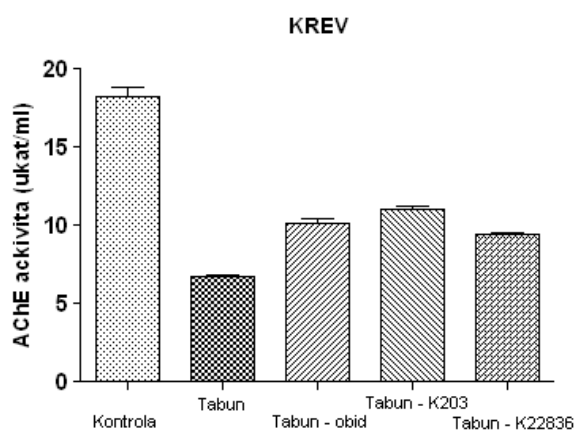
Statistické hodnocení

Počet zvířat ve skupině byl šest. Aktivitu enzymu v krevním hemolyzátu byly vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka, pro zjištění statisticky vý-znamné změny mezi jednotlivými skupinami byl použit t-test.

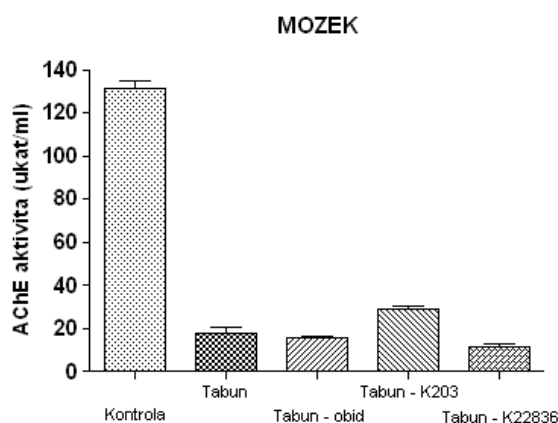
Výsledky

Z výsledků vyplývá, že po podání dávky 1 LD₅₀ tabunu došlo k výraznému poklesu aktivit cholin-esteras, a to nejen na periférii (krev), ale také v CNS. V krvi došlo k poklesu na 37 % a v CNS na 12 % původní aktivity enzymu. U skupin, kterým byla po-dána kombinovaná terapie, došlo nejen k zlepšení klinického stavu jedinců, ale také k signifikantnímu zvýšení aktivity inhibovaných cholinesteras (ze-jména v krvi). Nejlepší účinek vykázal oxim K203, který reaktivoval inhibovaný enzym na hodnotu 61 % v krvi vzhledem k původní aktivitě enzymu. Terape-utická účinnost nově syntetizované látky K22836, fluorovaného oximu K203, byla srovnatelná s účin-ností standardně užívaného obidoximu (viz graf 1).

V CNS došlo také k mírnému navýšení aktivity AChE – nejlepší reaktivační účinnost byla zazna-menána opět po podání K203 (22 %). Reaktivátory K22836 a obidoxim na úrovni CNS nevykázaly žádný terapeutický efekt (viz graf 2).



Graf 1: Terapeutická účinnost oximů v krvi



Graf 2: Terapeutická účinnost oximů v CNS

Diskuse

Jak již bylo řečeno v úvodu, stěžejní otázkou v terapii otrav OFI, tedy i nervově paralytických látek, je vstup terapeutik do CNS. Atropin, který je také převážně periferně působící, je možno nahradit analogy, jako jsou skopolamin či benaktazin, u nichž byl prokázán lepší centrální terapeutický efekt. Pro účinnost reaktivátorů je důležité, aby zůstala ve struktuře zachována oximová skupina, která je zodpovědná za vlastní reaktivaci. Avšak její přítomnost zároveň zvyšuje hydrofilitu. Dalším faktorem, jenž je nepříznivý pro průnik oximů přes HEB, je přítomnost kvarterního dusíku (7).

Možností jak zvýšit průnik látek do CNS je několik. Jednou z cest je zavedení pro tělo přirozené části do struktury oximu, uvažuje se o zavedení analogů aminokyselin, steroidů, popř. modifikované cukerné části. Tato změna ve struktuře umožní využít fyziologické přenašečové systémy zabudované v HEB. U takto pozměněných reaktivátorů je však předpokládán výrazný nárůst toxicity (8).

Další možností je využití tzv. prodrug neboli terapeutik, která se na účinná terapeutika změní až v místě působení pomocí místního fyziologického enzymatického systému. U reaktivátorů je potřeba „ukrýt“ náboj na dusíku nebo hydrofilní oximovou skupinu do doby, než prostoupí přes HEB.

Také zvýšení lipofility může příznivě ovlivnit zvýšení koncentrace terapeutika v CNS. Princip zvýšení lipofility je založen na zmenšení počtu hydrofilních skupin nebo zavedení nových skupin lipofilních do struktury léčiva. Tento princip byl využit také v případě fluorace oximu K203. Po zavedení fluoru došlo u tohoto oximu k snížení reaktivační

účinnosti, což se předpokládalo. Terapeutický efekt po zavedení fluoru byl srovnatelný s terapeutickou účinností standardně užívaného reaktivátoru obidoximu. Bohužel však nebyla prokázána ani vyšší účinnost na úrovni CNS, aktivita cholinesteras v CNS byla po podání K22836 signifikantně nižší než po podání obidoximu. Naš předpoklad možnosti zvýšení průniku přes HEB tak nebyl prokázán.

Závěr

Sledování změn aktivit cholinesteras v biologických vzorcích prokázalo zvýšení aktivity sledovaných enzymů po podání oximových reaktivátorů. Nejlepší terapeutický efekt jak v krvi, tak v CNS byl pozorován po podání oximu K203. Tento reaktivátor prokázal lepší reaktivační schopnost vůči tabunu než v terapii standardně zavedený reaktivátor obidoxim a nově připravený oxim K22836.

Uvedená práce byla vypracována díky podpoře grantu Ministerstva obrany České republiky OPUOFVZ200503.

Literatura

1. ALDRIDGE, WN. Organophosphorus compounds and carbamates, and their reactions with esterases. *Brit. Med. Bul.*, 1969, vol. 25, p. 239–239.
2. BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.*, 2004, vol. 38, p. 151–216.
3. BAJGAR, J. – FUSEK, J. – KUČA, K., et al. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase re-

- activators: facts and fiction. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2007, vol. 7, p. 461–466.
4. KASSA, J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *Clin. Toxicol.*, 2002, vol. 40, no. 6, p. 803–816.
 5. MUSILEK, K. – JUN, D. – CABAL, J. Design of a potent reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase--synthesis and evaluation of (E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide (K203). *J. Med. Chem.*, 2007, vol. 50, p. 5514–5518.
 6. LORKE, DE. – HASAN, MY. – NURULAIN, SM., et al. Entry of two new asymmetric bispiridium oximes (K-27 and K-48) into the rat brain: comparison with obidoxime. *J. Appl. Toxicol.*, 2007, vol. 27, p. 482–490.
 7. TSUKITA, S. – FURUSE, M. – ITOH, M. Multifunctional strance in tight junctions. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2001, vol. 2, p. 285–293.
 8. LORKE, DE. – KALASZ, H. – PETROIANU, GA., et al. Entry of oximes into the brain: a review. *Curr. Med. Chem.*, 2008, vol. 15, p. 743–753.
- Korespondence: Npor. PharmDr. Jana Žďárová Karasová
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Katedra toxikologie
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: karasova@pmfhk.cz
- Do redakce došlo 27. 4. 2009
-