

NOVÉ BISKVARTERNÍ INHIBITORY ACETYLCHOLINESTERASY JAKOŽTO PROFYLAKTIKA PŘI OTRAVĚ ORGANOFOSFÁTY

¹Růžena PAVLÍKOVÁ, ¹Jan MAREK, ¹Kamil MUSÍLEK, ¹Josef FUSEK, ^{1,2}Kamil KUČA, ¹Jana ŽDÁROVÁ KARASOVÁ,

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

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

Souhrn

Za profylaktická antidota jsou považována farmaka, která zabrání intoxikaci organismu nebo zlepší její prognózu, jsou-li podána před expozicí toxickou látkou. V terapii používaným profylaktickým antidotem, které chrání organismus před intoxikací organofosforovými sloučeninami, je pyridostigmin chlorid jako reverzibilní inhibitor acetylcholinesterasy (AChE). Práce je zaměřena na hledání nových inhibitorů AChE, které by měly uplatnění v profylaxi intoxikací OP. Bylo připraveno 15 symetrických biskvarterních inhibitorů a byla testována jejich inhibiční schopnost standardní in vitro metodou. Jako nejvhodnější inhibitor AChE byl na základě hodnoty IC_{50} vybrán but-(2E)-en-1,4-diyl-1,1'-bis(4-(4-nitrobenzyl)-pyridinium)-dibromid.

Klíčová slova: Acetylcholinesterasa; Inhibitory; Nervově paralytické látky; Profylaxe.

New Bisquaternary Inhibitors of Acetylcholinesterase Used as a Prophylactics in Organophosphorus Poisoning

Summary

The prophylactic antidotes are pharmaceuticals which can prevent the intoxication of the human body or may improve its prognosis if administered before the exposure to a toxic substance. Pyridostigmine chloride, a reversible acetylcholinesterase (AChE) inhibitor, is used as a prophylactic antidote which may prevent the organism from organophosphorus poisoning (OP). This paper is focused on searching new AChE inhibitors that might be used in prophylactic treatment of OP intoxications. The aim of this study was to prepare 15 symmetric bisquaternary inhibitors and to evaluate their inhibition ability (IC_{50}) via a standard in vitro method. The but-(2E)-en-1,4-diyl-1,1'-bis(4-(4-nitrobenzyl)-pyridinium) dibromide was selected, on the basis of IC_{50} value, the most potent AChE inhibitor.

Key words: Acetylcholinesterase; Inhibitors; Nerve agents; Pretreatment.

Úvod

Organofosforové inhibitory (OP) acetylcholinesterasy (AChE, EC 3.1.1.7) jsou zkoumány od 30. let 20. století (5). Původně tyto sloučeniny byly využívány jako insekticidy, ale díky vysoké toxicitě byly posléze použity jako bojové chemické látky (BCHL) (15). Nebezpečnou skupinu organofosforových sloučenin představují nervově paralytické látky (NPL). Vyznačují se výrazně vyšší toxicitou vůči savcům (13). Do organismu pronikají všemi možnými cestami vstupu, i přes neporušenou kůži, nástup účinku je rychlý (15). Jejich používání je zakázáno úmluvou o zákazu chemických zbraní, která byla v roce 1997 ratifikována 65 státy světa (13). Syntéza je relativně snadná, proto tyto látky mohou být zneužity jako zbraně hromadného ničení a nástroje teroristických útoků. O možnosti zneužití NPL svědčí teroristický útok v tokijském metru z 90. let minulého století (12).

Při kontaktu OP s organismem je blokován seri-

nový hydroxyl aktivního místa enzymu. Inhibovaný enzym není schopen hydrolyzovat zvýšené množství acetylcholinu (ACh) v periferních efektech, vegetativních gangliích a v nervosvalovém spojení (1). Další stárnutí komplexu enzym–inhibitor vede k nezvratné (ireverzibilní) inhibici (10).

Podle lokalizace nahromadění ACh na příslušných receptorech popisujeme příznaky muskarinové, nikotinové a centrální (13). U jedince zasaženého OP se vyskytuje např. porucha akomodace čočky, zvýšené překrvení sliznic s edémem, zvýšená sekrece slinných, slzných, potních a bronchiálních žlázek, zvýšená střevní peristaltika až kolikovitá bolest, poruchy srdečního rytmu a záškuby jednotlivých skupin příčně pruhovalého svalstva. Nebezpečnost těchto látek tkví v kombinaci tří faktorů, a to bronchokonstrikce, paralýzy dýchacích svalů a útlumu dýchacího centra v prodloužené míše, které společně vedou k udušení intoxikovaného jedince.

Široká dostupnost OP v oblasti průmyslu, používání OP pesticidních přípravků a aktuální hrozba

teroristického zneužití BCHL dávají podnět k vývoji účinnější profylaktické i antidotní terapie (9). V armádách NATO je pro profylaxi před otravou NPL používán pyridostigmin chlorid. Je to reverzibilní inhibitor AChE, po určité době dochází k obnovení aktivity, a enzym tak znovu plní svou fyziologickou funkci (16). Profylaktická účinnost pyridostigminu (i jiných karbamátů) je limitována podanou dávkou. Se zvyšující se dávkou roste profylaktická účinnost i výskyt nežádoucích účinků. Doporučená dávka pro toto profylaktikum u otrav NPL je 30 mg po 8 hodinách (3). Vedlejšími účinkům lze předejít podáváním společně s anticholinergiky. Nejvhodnější je kombinace pyridostigminu s benaktyzinem a trihexyfenidilem (4). Pro účely profylaxe NPL bylo testováno mnoho látek s různým mechanismem účinku (blokátor kalciových kanálů nimodipin, periferní myorelaxans tubokurarin, antagonist opiových receptorů meptazinol). Jejich účinnost však nebyla prokázána jako významná v porovnání s protektivními účinky pyridostigminu (2). Dalším možným principem profylaxe je podání enzymu, jenž na sebe naváže molekuly OP (tzv. stechiometrický scavenger), nebo je rozštěpí (tzv. katalytický scavenger) (3).

Materiál a metody

Testované inhibitory AChE (tab. 1) byly připraveny na katedře toxikologie FVZ UO (6). Použité chemikálie analytické čistoty byly zakoupeny od fy Sigma-Aldrich. Reakční směs byla míchána při refluxu acetonitrilu po dobu 8 hodin. K ověření čistoty nově syntetizovaných látek byla použita tenkovrstvá chromatografie (7), prováděná na deskách DC-Alufolien Celulose-F (Merck) s mobilní fází butanol–voda–kyselina octová (5:2:1). K důkazu přítomnosti kvarterních látek bylo použito Dragendorffovo činidlo – zásobní roztok: 850 mg zásaditého dusičnanu vizmutitého + 40 ml destilované vody + 10 ml koncentrované kyseliny octové a 8 g jodidu draselného + 20 ml destilované vody; ředěný roztok pro vlastní detekci: 5 ml zásobního roztoku + 10 ml konc. kyseliny octové + 50 ml destilované vody. Fyzikálně-chemické charakteristiky syntetizovaných biskvarterních sloučenin byly popsány dříve (11).

Jako zdroj AChE byl použit 10% homogenát mozku laboratorního potkana (kmen Wistar). Stanovení inhibičních aktivit bylo prováděno *in vitro* metodou (8) s využitím automatického titrátoru RTS 822 (Metrohm, Švýcarsko). Nasyntetizované sloučeniny

byly rozpuštěny v 5 ml destilované vody a na pH statu upraveno pH roztoku na 7,6 přidáním 0,1 M NaOH. Po ustálení byl roztok doplněn destilovanou vodou na celkový objem 6 ml. Nejprve byla pomocí titrátoru změřena aktivita AChE. Do titrační kádinky s magnetickým míchadlem bylo odměřeno 20 ml destilované vody, 2,5 ml NaCl a 0,5 ml mozkového homogenátu. Při dosažení pH = 7,9 byly do titrační kádinky přidány 2 ml acetylcholin jodidu (AChI).

Poté byly postupně měřeny afinity připravených sloučenin k AChE v koncentrační radě (10^{-9} – 10^{-2} M). Do titrační nádoby s magnetickým míchadlem bylo odměřeno 19,8 ml destilované vody, 200 μ l vzorku dané koncentrace inhibitoru, 2,5 ml NaCl a 0,5 ml mozkového homogenátu. Po dosažení pH = 7,9 opět přidáno 2 ml AChI.

Princip stanovení afinity biskvarterních inhibitorů k AChE

AChE štěpí přidáný substrát (AChI) za vzniku cholinu (Ch) a kyseliny octové (AA) (schéma 1). Pomocí pH statu je udržováno pH = 8 dotitrováním 0,01 M roztokem NaOH. Spotřeba NaOH je úměrná množství AA, která vznikla rozkladem AChI enzymem (AChE). Při inhibici AChE se snižuje aktivita enzymu, sníží se i množství vzniklé AA a tím i spotřeba NaOH.

Výsledky

Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA) a byly zjištěny intervaly spolehlivosti (tab. 1). Odlehle hodnoty enzymové aktivity byly vyloučeny pomocí Dean-Dixonova testu (StatXact 7. Statistical software for exact nonparametric inference. Cytel Inc., 2005). Látka číslo 15 nebyla shledána inhibitorem AChE, jelikož její naměřená hodnota afinity v různých koncentracích byla po pěti opakovaných měřeních stále rovna nule.

Nejúčinnějším inhibitorem AChE byla na základě hodnoty IC_{50} shledána sloučenina 14 but-(2E)-en-1,4-diyl-1,1'-bis(4-(4-nitrobenzyl)-pyridinium)-dibromid. Uvedená sloučenina má největší schopnost inhibovat potkaní AChE.

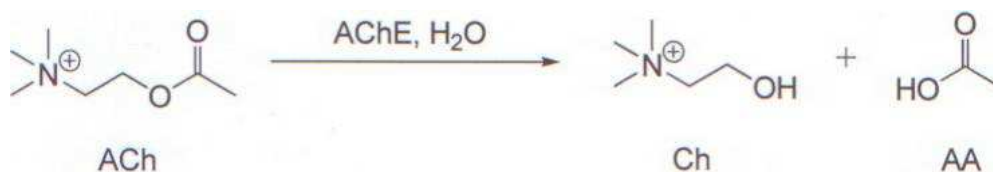
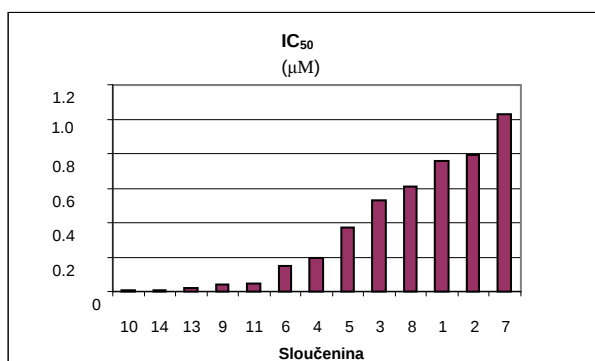


Schéma 1: Enzymatická reakce pro stanovení aktivity acetylcholinesterasy

Tabulka 1

Přehled testovaných inhibitorů AChE, molekulových hmotností, hodnot IC_{50} a 95 % CI

		M_r	IC_{50} [μM]	95 % konfidenční interval
1	CH_3	307,04	0,762	$3,735 \times 10^{-4} - 1,554 \times 10^{-3}$
2	CH=NOH	336,04	0,795	$6,352 \times 10^{-4} - 9,952 \times 10^{-4}$
3	C_2H_5	321,06	0,531	$3,681 \times 10^{-4} - 7,661 \times 10^{-4}$
4	C_3H_7	335,09	0,197	$1,212 \times 10^{-4} - 3,198 \times 10^{-4}$
5	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	349,12	0,371	$2,684 \times 10^{-4} - 5,132 \times 10^{-4}$
6	CN	318,02	0,150	$1,109 \times 10^{-4} - 2,013 \times 10^{-4}$
7	OH	309,01	1,034	$7,487 \times 10^{-4} - 1,425 \times 10^{-3}$
8	COCH_3	335,05	0,610	$4,179 \times 10^{-4} - 8,904 \times 10^{-4}$
9	fenyl	369,11	0,041	$3,389 \times 10^{-5} - 5,064 \times 10^{-5}$
10	benzyl	383,11	0,007	$4,411 \times 10^{-8} - 8,640 \times 10^{-6}$
11	$(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	351,09	0,049	$4,156 \times 10^{-5} - 5,815 \times 10^{-5}$
12	COOH	336,04	16,768	$7,990 \times 10^{-3} - 3,519 \times 10^{-2}$
13	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	336,08	0,023	$1,788 \times 10^{-5} - 2,900 \times 10^{-5}$
14	4-nitrobenzyl	428,13	0,009	$5,749 \times 10^{-6} - 1,274 \times 10^{-5}$
15	3-fenylpropyl	411,19	-----	-----

Graf 1: Znáznornění hodnot IC_{50} syntetizovaných inhibitorů AChE

Významnými inhibitory jsou také podle grafu 1 sloučeniny číslo **11** a **13**, jejichž hodnoty IC_{50} se od sebe výrazně neliší. Naopak nejmenší inhibiční schopnost byla zjištěna u sloučeniny číslo **12**.

Diskuse

V průběhu této studie jsme se snažili najít inhibitor AChE, který by mohl být využit jako terapeutikum intoxikací způsobených OP. Mechanismus terapeutického účinku reverzibilního inhibitoru je charakterizován vznikem nekovalentní vazby těchto

látek na enzym AChE. Tímto AChE zablokují a chrání před následným navázáním OP, které jsou schopny vytvořit s tímto enzymem kovalentní vazbu. Po určité době dochází u reverzibilních inhibitorů k jejich uvolnění z vazby na AChE, k zvýšení počtu aktivních molekul enzymu v synaptických a nervosvalových spojeních a následné úpravě stavu intoxikovaného pacienta.

Měřením bylo zjištěno, že látka **15** but-(2E)-en-1,4-diyl-1,1'-bis(4-(3-phenylpropyl)-pyridinium)-dibromid enzym neinhibovala. Do dalšího zpracování látka již nebyla zahrnuta. Většina biskvarterních látek byla ve vodě rozpustná, výjimku tvoří sloučenina **9** but-(2E)-en-1,4-diyl-1,1'-bis(4-phenylpyridinium) dibromid, která byla pro účely získání inhibiční aktivity rozpuštěna v dimethylformamidu. Z výše uvedeného důvodu však nelze srovnávat její hodnotu IC₅₀ s ostatními hodnotami.

Změna struktury připravené sloučeniny ovlivňuje její inhibiční aktivitu. Jako nejméně účinné se jeví látky obsahující ve své molekule nukleofilní skupinu (OH, CH=NOH), která pravděpodobně významně ovlivňuje aktivitu těchto látek vzhledem k AChE. Další významnou korelaci lze pozorovat při narůstání jednoduchého alkylového řetězce, kde se s narůstajícím počtem uhlíků relativně zvyšuje inhibiční aktivita (methyl<ethyl<propyl). Dále usuzujeme, že přítomnost aromatického jádra jako substituentu v poloze 4 (fenyl, benzyl či substituovaný benzyl), významně zvyšuje afinitu látky k enzymu (fenyl<benzyl<4-nitrobenzyl).

Z testované skupiny prokázala sloučenina **14** but-(2E)-en-1,4-diyl-1,1'-bis(4-(4-nitrobenzyl)-pyridinium)-dibromid největší schopnost inhibovat potkaní AChE. V dalších *in vitro* experimentech bude nutné detailně tuto sloučeninu porovnat s používanými standardy a potvrdit, popř. vyloučit její vhodnost pro testování *in vivo*.

Literatura

1. BAJGAR, J. *Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie*. 1. vyd. Praha, Avicenum, 1985.
2. BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Adv. Clin. Chem.*, 2004, vol. 38, p. 151–216.
3. BARTOŠOVÁ, L., 2006. Otravy nervově paralytickými látkami: co o nich víme? *Čs. Fyziol.*, 2006, roč. 55, č. 2, s. 66–75.
4. BARTOŠOVÁ, L. – BAJGAR, J. Vývoj a nové trendy v profylaxi otrav organofosfáty. *Čs. Fyziol.*, 2005, roč. 54, č. 4, 185 s.
5. CABAL, J. – KUČA, K. – BAJGAR, J. Vazebné vlastnosti látek obsahujících kvarterní dusík vůči enzymu AChE. *Chem. Listy*, 1997, 2001–2007, Liblice 2003, dodatky, 1201 s.
6. ČEGAN, A. – KAVÁLEK, J., et al. *Návody pro laboratorní cvičení z organické chemie*. 1. vyd. Pardubice, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, katedra organické chemie, 1996.
7. GASPARIČ, J. – CHURÁČEK, J. *Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin*. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1981.
8. KASSA, J. – CABAL, J. A comparison of the efficacy of a new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with presently used oximes and H oximes against sarin by in vitro and in vivo methods. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1999, vol. 18, p. 560–565.
9. KUČA, K. – CABAL, J. – MUSILEK, K., et al. Effective bisquaternary reactivators of tabun-inhibited AChE. *J. Appl. Toxicol.*, 2005, vol. 25, p. 491–495.
10. KUČA, K. Vztah mezi strukturou reaktivátorů acetylcholinesterázy a jejich reaktivací účinností. (Disertační práce). Hradec Králové, 2005. Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví.
11. MUSILEK, K. – PAVLIKOVÁ, R., et al. Preparation, in vitro screening and molecular docking of symmetrical bisquaternary cholinesterase inhibitors bearing but-(2E)-en-1,4-diyl connecting linkage. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 2010, in press.
12. OHBU, S., et al. Sarin poisoning in Tokyo subway. *South Med. J.*, 1997, vol. 90, p. 587–593.
13. PATOČKA, J., et al. *Vojenská toxikologie*. 1. vyd. Praha, Grada Publishing, 2004. ISBN 80-247-0608-3.
14. PATOČKA, J. – JUN, D. – KUČA, K. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase-important enzymes of human body. *Acta medica*, 2004, vol. 47, no. 4, p. 215–228.
15. PRYMULA, R., et al. *Biologický a chemický terorismus*. 1. vyd. Praha, Grada Publishing, 2002. ISBN 80-247-0288-6.
16. WABERŽINEK, G. – KRAJÍČKOVÁ, D., et al. *Speciální neurologie*. 1. vyd. Praha, Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1020-5.

Korespondence: Mgr. Růžena Pavlíková
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Katedra toxikologie
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: pavlikovaruzena@seznam.cz

Do redakce došlo 3. 6. 2009