

SROVNÁVÁNÍ ÚČINNOSTI REAKTIVÁTORŮ ACETYLCHOLINESTERASY INHIBOVANÉ TABUNEM

CABAL J., KUČA K., JUN D., BAJGAR J., HRABINOVÁ M.

Univerzita obrany v Hradci Králové, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra toxikologie

SOUHRN

Srovnávání účinnosti reaktivátorů acetylcholinesterasy inhibované tabunem

Nervově paralytická látka tabun inhibuje enzym acetylcholinesterasu (AChE; EC 3.1.1.7) za vzniku kovalentní vazby. Díky tomu nemůže tento enzym plnit v organismu svou funkci a následně dochází k cholinergní krizi. Reaktivátory AChE (pralidoxim, obidoxim a HI-6) se užívají jakožto kauzální antidota při otravách nervově paralytickými látkami. Jejich úkolem je štěpit vzniklou vazbu mezi enzymem a inhibitorem. Bohužel jejich schopnost reaktivovat tabunem inhibovanou AChE je nízká. Cílem této práce bylo najít nejúčinnější reaktivátor AChE inhibované tabunem. Bylo otestováno osm reaktivátorů AChE – pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, HI-6, methoxim, HI-6 a nově syntetizované reaktivátory K027 a K048. Všechny látky byly testovány standardním *in vitro* reaktivacním testem (pH 8, 25 °C, inhibice 30 min, reaktivace 10 min). Z výsledků vyplývá, že jen trimedoxim dosáhl 50 % reaktivace enzymu. Těto poměrně silné reaktivacní schopnosti bylo dosaženo při vysoké koncentraci reaktivátoru (10^{-2} M). Pouze čtyři látky (trimedoxim, obidoxim, K027 a K048) reaktivovaly tabunem-inhibovanou AChE při nižší koncentraci 10^{-4} M (pravděpodobně dosažitelné *in vivo*) v rozmezí od 10 do 18 %.

Klíčová slova: acetylcholinesterasa – reaktivátory – nervově paralytické látky – tabun – oximy

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 192–195

SUMMARY

A Comparison of the Efficacy of the Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited with Tabun

The nerve agent tabun inhibits acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) by the formation of a covalent bond with the enzyme. Afterwards, AChE is not able to fulfil its role in the organism and subsequently cholinergic crisis occurs. AChE reactivators (pralidoxime, obidoxime and HI-6) as causal antidotes are used for the cleavage of the bond between the enzyme and nerve agent. Unfortunately, their potency for reactivation of tabun-inhibited AChE is poor. The aim of the study was to choose the most potent reactivator of tabun-inhibited AChE. We have tested eight AChE reactivators – pralidoxime, obidoxime, trimedoxime, HI-6, methoxime, HI-6 and our newly synthesized oximes K027 and K048. All reactivators were tested using our standard *in vitro* reactivation test (pH 8, 25°C, time of inhibition by the nerve agent 30 minutes, time of reactivation by AChE reactivator 10 minutes). According to our results, only trimedoxime was able to achieve 50% reactivation potency. However, this relatively high potency was achieved at high oxime concentration (10-2 M). At a lower concentration of 10-4 M (the probably attainable concentration *in vivo*), four AChE reactivators (trimedoxime, obidoxime, K027, and K048) were able to reactivate AChE inhibited by tabun reaching from 10 to 18 %.

Key words: acetylcholinesterase – reactivators – nerve agents – tabun – oximes

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 192–195

Má

Úvod

Nervově paralytické látky (NPL), jako jsou tabun, VX, soman či sarin, patří mezi účinné inhibitory enzymu acetylcholinesterasy (AChE; EC 3.1.1.7). Interagují s AChE za vzniku kovalentní vazby, jejíž poločas rozpadu je řádově hodiny až dny v závislosti na užití NPL^{1,2}. Pro-

tože tato spontánní reaktivace enzymu je pomalá, a v případě somanu dokonce nenastane díky jinému procesu zvanému aging („stárnutí“), hovoříme o těchto látkách jako o ireverzibilních inhibitorech AChE¹.

Pro navrácení původní funkce enzymu se užívá reaktivátorů AChE. Jako jejich nejznámější zástupce lze zmínit pralidoxim (2-PAM; 2-hydroxyiminomethyl-1-met-

hylpyridinium chlorid), obidoxim (Toxogonin®; 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxa-propan dichlorid) či látku HI-6 (1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxa-propan dichlorid)³⁾. Jejich reaktivační efekt spočívá ve štěpení vazby vzniklé při inhibici mezi enzymem a nervově paralytickou látkou.

Aldoximová skupina reaktivátoru přechází při pH lidské krve na oximátový aniont, který je vlastním nukleofilem napadajícím vazbu mezi enzymem a inhibitorem. Po odštěpení inhibitoru z enzymu vzniká fosforylovaný oxim, který je následně detoxikován organismem, a volný enzym, jež může opět plnit svou fyziologickou roli v organismu.

Tabun (GA; O-ethyl-N,N-dimethyl fosforamidokyanidát) je považován za jednu z extrémně toxických bojových látek. Hodnota letální dávky (LD_{50}) se pohybuje v závislosti na bráně vstupu od 66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.v.) po 3700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (p.o.)^{1, 3, 4)}. Poprvé byl syntetizován před druhou světovou válkou v Německu ve firmě IG Farben jako potenciální pesticid. Ačkoliv nebyl doposud použit ve válečném konfliktu, bylo zjištěno, že Irák měl tuto látku začleněnou do výzbroje během 1. války v Peršském zálivu⁵⁾.

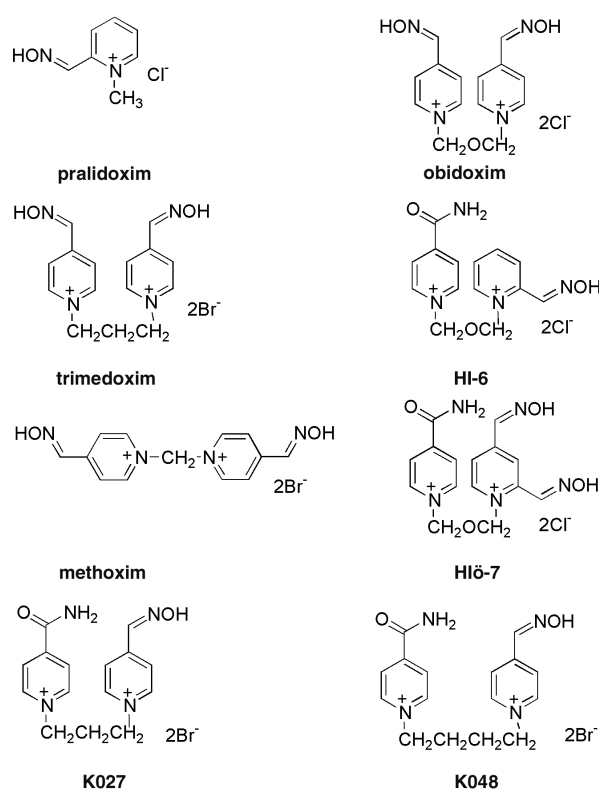
V současné době je považována za nejúčinnější reaktivátor AChE (začleněn i v antidotní výbavě Armády ČR) látka HI-6. Bohužel její účinnost při léčbě intoxikací tabunem je nízká^{6, 7)}. Reaktivační schopnost obidoximu, jenž je rovněž v antidotní výbavě AČR, rovněž není dostačující⁷⁾. Díky stále možnosti ohrožení teroristickými útoky (např. sarinový útok v tokijském metru v roce 1995) se výzkum v oblasti syntézy a testování nových reaktivátorů AChE stále rozvíjí⁸⁻¹⁰⁾.

V práci jsme se zaměřili na zhodnocení reaktivačního účinku osmi reaktivátorů AChE na tabunem-inhibovanou AChE. V experimentu jsme užívali v současnosti preferovanou látku HI-6, dále pak pralidoxim zavedený armádou USA, látku HIö-7 (1-(2,4-dihydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxa-propan dichlorid) testovanou pro potenciální užití německou armádou, obidoxim a methoxim zavedený v armádě ČR, trimedoxim (dříve zavedený, později stažený z antidotní výbavy AČR) a nově syntetizované látky – oximy K027 (1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-propan dibromid) a K048 (1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-karbamoylpyridinium)-butan dibromid) (obr. 1).

POKUSNÁ ČÁST

Materiál a metody

Testované reaktivátory AChE byly získány z komerčních zdrojů (pralidoxim a obidoxim – Léčiva (ČR), respektive Merck (Německo)), jako dar (HIö-7 – Prof. Szincz, Institut farmakologie a toxikologie, Mnichov, Německo) nebo byly syntetizovány již dříve na našem pracovišti (methoxim, HI-6, trimedoxim, K027, K048). Jejich čistota byla stanovena pomocí TLC (DC-Alufolien Cellulose F; mobilní fáze –



Obr. 1. Struktury testovaných reaktivátorů AChE

n-butanol:kyselina octová:voda – 5:1:2; Dragendorfovo činidlo) a teploty tání (Boetius Block). Všechny další užití chemikálie analytické čistoty byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (ČR).

Nervově paralytická látka tabun (čistota 89 %) byla získána z Vojenského technického ústavu ochrany (Brno). Jako zdroje AChE bylo užití homogenátu z mozků laboratorního potkana. Reaktivační účinnost byla testována *in vitro* na AChE inhibované tabunem užitím standardního reaktivačního testu (Kuča a Kassa, 2003)¹¹⁾.

Homogenát z mozků laboratorního potkana (0,5 ml) byl smíchán s 20 μl isopropylalkoholového roztoku tabunu (10^{-6} M) a inkubován za teploty 25 °C po dobu 30 min. Poté bylo ke směsi přidáno 2,5 ml roztoku chloridu sodného (3 M) a doplněno na celkový objem 23 ml. Nakonec byly přidány 2 ml roztoku acetylcholinu jodidu (0,02 M). Enzymová aktivita byla měřena při pH 8,0 a teplotě 25 °C na autotitrátoru RTS 822 (Radiometer; Dánsko). Aktivita intaktního (a_0) a tabunem-inhibovaného (a_i) enzymu byly odečteny ze závislosti spotřeby roztoku hydroxidu sodného (0,01 M) na čase. K roztoku tabunem-inhibované AChE byl přidán roztok reaktivátoru dané koncentrace a celá směs byla inkubována po dobu 10 minut. Aktivita reaktivované AChE (a_r) byla opět odečtena ze závislosti spotřeby roztoku hydroxidu sodného na čase.

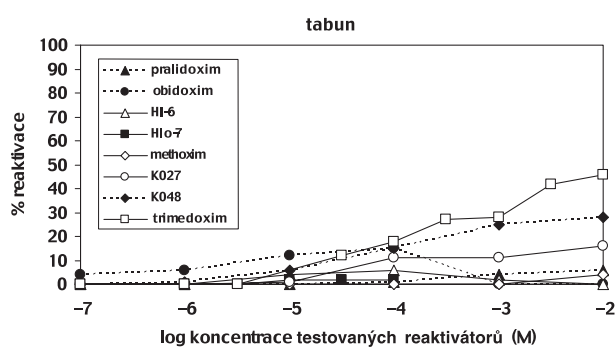
Hodnoty počátečních rychlostí získané z aktivit intaktního, inhibovaného a reaktivovaného enzymu (a_0 ; a_i ; a_r) umožnily výpočet rychlostních (k_R ; k_i) a disociačních konstant (K_{DIS} ; K_R) charakterizujících celý reaktivační proces. Disociační konstanty K_{DIS} a K_R charakterizují afinitu reaktivátorů k neinhibované respektive inhibované AChE. Rychlostní konstanta k_R je rychlostní konstanta prvního řádu charakterizující rozpad komplexu enzym-inhibitor. Rychlostní konstanta k_i je rychlostní konstantou druhého řádu charakterizující rychlost celého reaktivačního procesu.

Tab. 1. Kinetické parametry reaktivace tabunem inhibované AChE

Reaktivátor acetylcholinestery	K_{DIS} (mM)	K_R (mM)	k_R (min ⁻¹)	k_T (min ⁻¹ .M ⁻¹)
methoxim	2000	*	*	*
HIö-7	7	*	*	*
pralidoxim	210	575	0,006	10
trimedoxim	21 000	460	0,079	172
K027	5888	54	0,015	273
K048	228	93	0,032	348
HI-6	24	6	0,007	1111
obidoxim	280	3	0,020	6667

* Z naměřených hodnot nebylo možné vypočítat kinetické konstanty charakterizující reaktivací proces.

K_{dis} – disociační konstanta komplexu enzym-reaktivátor, K_R – disociační konstanta komplexu inhibovaný enzym-reaktivátor, k_R – rychlostní konstanta prvního řádu, k_T – rychlostní konstanta druhého řádu



Obr. 2. Závislost reaktivace (%) na koncentraci oximu (M)

VÝSLEDKY

Výsledky charakterizující reaktivací proces, rychlostní konstanty k_R či k_T a rovnovážné konstanty K_{DIS} či K_R , jsou znázorněny v tabulce 1. Nejnižší hodnota konstanty K_{DIS} charakterizující afinitu reaktivátoru k intaktnímu enzymu byla dosažena u látky HIö-7. To znamená, že tento reaktivátor AChE má nejvyšší afinitu k enzymu. Nejvyšší afinitu (nejnižší hodnoty konstanty K_R) k inhibovanému enzymu má obidoxim. Rychlostní konstanta k_R charakterizující rozpad komplexu enzym-inhibitor je nejvyšší pro trimedoxim. Rychlostní konstanta k_T charakterizující rychlost celého reaktivacího procesu, vypočítaná ze vztahu $k_T = k_R / K_R$, favorizuje obidoxim.

Ze závislosti reaktivací účinnosti na koncentraci reaktivátorů AChE (obr. 2) vyplývá, že pouze jeden z testovaných reaktivátorů je schopen reaktivovat AChE inhibovanou tabunem z více než 50 %. Nejúčinnější reaktivátor AChE, trimedoxim, dosáhl reaktivací schopnosti 53 %. Ačkoliv tento reaktivátor dokázal procentuálně nejlépe reaktivovat tabunem inhibovanou AChE, této účinnosti bylo dosaženo při koncentraci 10^{-2} M. Této koncentrace však nelze v živém organismu dosáhnout, protože reaktivátory AChE jsou ve vyšších koncentracích toxické ¹¹. Jejich LD_{50} pro laboratorní myši se pohybují od 48 do 671 mg/kg v závislosti na užitém reaktivátoru ¹².

Pokud se uvažuje o podání člověku, reálně dosažitelná koncentrace oximu v lidském organismu je odhadována na 10^{-4} M ^{1, 3}. Při této koncentraci jen čtyři reaktivátory AChE dosahují reaktivací účinnosti nad 10 % – trimedoxim (18 %), obidoxim (15 %), K048 (15 %) a K027 (11 %).

DISKUZE

Po první válce v Perském zálivu se dostala problematika reaktivací tabunem-inhibované AChE do popředí, protože bylo zjištěno, že tuto látku měl Irák ve své výzbroji ⁵.

Tabun je účinný inhibitor AChE. Při inhibici AChE tímto organofosfátem vzniká kovalentní vazba, jejíž štěpení nukleofilními činidly, v našem případě reaktivátory, je obtížné díky přítomnosti volného elektronového páru na dusíku obsaženém v jeho molekule. Tento volný elektronový vyrovnává elektronovou vakanci na atomu fosforu, a tím snižuje schopnost nukleofilu tento atom atakovat ^{13, 14}.

Žádná z armád NATO nemá účinný reaktivátor schopný uspokojivě reaktivovat tabunem-inhibovanou AChE. Jako nejúčinnější se jeví obidoxim zavedený v Armádě ČR. Naše práce potvrzuje, že tato látka je schopná reaktivovat tabunem-inhibovaný enzym, a zároveň poukazuje na to, že existují účinnější doposud nezavedené reaktivátory – trimedoxim a K048.

Naše výsledky potvrzují pravidlo, že nejúčinnější reaktivátory tabunem inhibované AChE by měly splňovat dva základní strukturální požadavky. Prvním je přítomnost oximové skupiny v poloze čtyři na pyridinovém jádře ¹⁵. Druhým požadavkem je přítomnost tříčlenného spojujícího řetězce mezi dvěma pyridinovými jádry, který neobsahuje elektronegativní atomy ¹⁶.

Obidoxim se liší od obou účinnějších reaktivátorů AChE přítomností kyslíku ve spojujícím řetězci. Volné elektronové páry atomu kyslíku pravděpodobně snižují jeho reaktivací schopnost.

Otázkou zůstává koncentrace oximu v mozku po

podání *in vivo*. Možnost průniku reaktivátorů AChE jakožto kvartérních látek přes hematoencefalickou bariéru (HEB) do mozku byla v minulosti diskutována¹⁷⁾, v současné době byl však jak průnik přes HEB, tak reaktivací účinek prokázán^{1, 3, 18, 19)}. *In vivo* byla prokázána reaktivace mozkové AChE potkanů i myši intoxikovaných sarinem a léčených směsí atropinu a různých reaktivátorů AChE^{18, 20)}.

Uvažovaná dosažitelná koncentrace v mozku (10^{-4} M) však není limitní pro reaktivací účinek oximu *in vivo*. Vzhledem k selektivnímu účinku jak nervově paralytických látek, tak reaktivátorů v různých částech mozku je zřejmé^{1, 3, 18)}, že aktivita AChE v pontomedulární oblasti koreluje s přežíváním pokusných zvířat. Zvýšení aktivity AChE o 5–10 % je pro přežití dostatečné^{1, 18)}.

Toto zvýšení je možné dosáhnout dokonce již při koncentracích 10^{-5} a 10^{-6} M^{1, 3)}, a proto se obě syntetizované látky jeví jako velmi účinné reaktivátory tabunem inhibované AChE.

Otázka jejich zavedení do Armády ČR jako nového antidota i přes nespornou účinnost je záležitostí dalšího výzkumného vývoje. V současné době jsou testovány na našem pracovišti standardním *in vivo* reaktivacím testem²¹⁾.

LITERATURA

1. **Bajgar, J.:** Adv. Clin. Chem., 2004; 38, 151.
2. **Marrs, T. C., Maynard, R. L., Sidell, F. R.:** Chemical Warfare Agents. Chichester, Wiley & Sons, 1996, 293 s.
3. **Kassa, J.:** J. Toxicol. Clin. Toxicol., 2002; 40, 803.
4. **Patočka, J. et al.:** Vojenská Toxikologie. Praha, Grada Publishing, 2004, 179 s.

5. **Bajgar, J.:** Historie používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu. Učební texty VLA Hradec Králové, Sv. 302, 1996, 112 s.
6. **Koplovitz, I., Stewart, J. R.:** Toxicol. Lett., 1994; 70, 169.
7. **Kuča, K., Kassa, J.:** Vet. Hum. Toxicol., 2004; 46, 15.
8. **Kuča, K., Bielavský, J., Cabal, J., Kassa, J.:** Bioorg. Med. Chem. Lett., 2003; 13, 3545.
9. **Yang, G. Y et al.:** Bull. Korean Chem. Soc., 2003; 24, 1368.
10. **Pang, Y. P. et al.:** Chem. Biol., 2003; 10, 491.
11. **Kuča, K., Kassa, J.:** J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 2003; 18, 529.
12. **Ševelová, L., Kuča, K., Krejčová, G.:** Toxicology, 2005; 207, 1.
13. **Eto, M.:** Organophosphorus pesticides: Organic and Biological Chemistry. Cleveland, CRC Press Inc., 1976, s. 142.
14. **Koplovitz, I. et al.:** Drug Chem. Toxicol., 1995; 18, 119.
15. **Cabal, J., Kuča, K., Kassa, J.:** Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol., 2004; 95, 81.
16. **Kuča, K., Patočka, J., Cabal, J.:** J. Appl. Biomed., 2003; 1, 207.
17. **Bajgar, J., Jakl, A., Hrdina, V.:** Biochem. Pharmacol., 1971; 20, 3230.
18. **Bajgar, J.:** Sb. Věd. Prací LF UK (Hrade Králové), 1991; 34, 5.
19. **Sakurada, K. et al.:** Neurochem. Res., 2003; 28, 1401.
20. **Kassa, J.:** Čes. slov. Farm., 1998; 1, 46.
21. **Ševelová, L. et al.:** J. Appl. Biomed., 2004; 2, 163.

Došlo 19. 1. 2005.

Přijato ke zveřejnění 13. 4. 2005.

Ing. Kamil Kuča
Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
e-mail: kucakam@pmfhk.cz,
kucakam@seznam.cz

LABORATOŘ 2005

výstava s odborným doprovodným programem na téma

Laboratorní technika, vybavení, pomůcky a služby laboratoří

Kongresové centrum Praha 14.–15. 9. 2005

Výstava je otevřená všem typům laboratorní praxe – provozním, analytickým, biochemickým, vodohospodářským, kontrolním, poloprovodním, školním a univerzitním laboratořím. Zve k návštěvě výstavy přístrojové techniky, vybavení a služeb laboratoří a souběžného odborného programu, naplněného přednáškami na témata související s řešením požadavků spojených s provozem laboratoří a zacházením s přístroji a chemickými látkami.

Více informací získáte na

Kontakt: Tomáš Rotrekl, B. Němcové 2625, 530 02 Pardubice,
tel.: 466 411 800, fax: 466 414 161, e-mail: info@laborator2005.cz