

EFIKASNOST REAKTIVATORA I  
SPAZMOLITIKA NAKON OTROVANJA  
AMITONOM\* IN VITRO

K. BRANKOV, S. HADŽOVIĆ i D. ERDELJAN

Zavod za farmakologiju i toksikologiju Veterinarskog  
fakulteta, Sarajevo

(Primitljeno 30. X 1975)

U radu je prikazano delovanje amitona (organskofosfornog inhibitora holinesteraze), nekih reaktivatora (morfolinijum oksima, MINE i PAM-2 Cl), metilatropina (holinolitik) i papaverina (spazmolitik) na izolovani mišji želudac. Ovaj izolovani organ upotrebljava se kao modelni sistem za razna ispitivanja u farmakologiji.

Amiton na izolovanom mišjem želucu izaziva snažan spastički efekat. Oksimi MINA i PAM-2 Cl infundirani u posudu za izolovane organe posle otrovanja amitonom, uklanjaju spazam i vraćaju kontrakcije na početne vrednosti, te je »funkcionalno oporavljanje« intoksiciranog organa trajno i potpuno. Morfolinijum oksim na ovu preparaciju deluje samo spazmolitički, verovatno direktno na receptore, a ne indirektno-reaktivatorski. Spazmolitički efekat ovog oksima je identičan efektima metilatropina i papaverina.

Ispitivanje efikasnosti reaktivatora, holinolitika i spazmolitika na spazam organa *in vitro* može da ukaže na uspešno lečenje ljudi i životinja otrovanih inhibitorima holinesteraze (1—4). Na osnovu eksperimenata na izolovanim organima može se utvrditi podesna upotreba oksima i holinolitika (5, 6).

Izolovani želudac raznih laboratorijskih životinja sa pripadajućim unutrašnjim i spoljnim nervima i do sada je bio upotrebljavan za farmakološka ispitivanja raznih supstancija (7). Ovaj organ omogućava analizu na osnovu simultane aplikacije i električne stimulacije unutrašnjih i spoljnih nerava, što se odražava na promeni kontrakcije longitudinalne muskulature želuca.

Cilj ovog rada bio je da se na izolovanom mišjem želucu sa pripadajućim nervima, kao modelnom sistemu za ispitivanja u farmakologiji,

\* dietil S-(2-dietilaminoetil) fosforotioat

ispita i uporedi efikasnost nekih reaktivatora holinesteraze (morfolinijum oksim, MINA i PAM-2 Cl) metilatropina i papaverina na spazam želuca izazvan amitonom. Amiton je ireverzibilni inhibitor holinesteraze i pripada grupi fosforilholina, gdje je azot u obliku amina tioestarski vezan za centralni atom fosfora.

#### MATERIJAL I METOD RADA

Za ekperimente su upotrebljeni beli miševi, oba pola, prosečne težine od oko 21 g. Ukupno je utrošeno 68 miševa, tj. svaka preparacija je ponovljena 4 puta.

Mišji želudac sa pripadajućim nervima (rr. anteriores gastrici n. vagi) ispreparira se po metodi *Hukovića* i saradnika (8). Ovaj izolovani organ je suspendovan u posudu za izolovane organe sa 20 ml Tirodeovog rastvora. Rastvor je gasiran karbogenom i zagrejan na 33° C. Nerv je uvučen u potopljenu elektrodu opisanu od *Burna* i *Randa* (9). Registracije su merene pomoću izotoničnog transdjusera na mikrodinamometru »Ugo Basile«.

Adaptacioni period je trajao 20 min. Izolovani želudac je stimulisan svake 2 minute u trajanju od 10 s. Stimulus je bio jačine 10 V, trajanja 1 ms i 30 Hz. Prvo se registrovalo 4—5 kontrolnih kontrakcija, a zatim je tuberkulinskom brizgalicom dodat amiton u konačnoj koncentraciji od  $10^{-5}$ M. 10 do 30 min nakon pojave spazma izolovanog želuca injicirani su pojedinačno reaktivatori holinesteraze (morfolinijum oksim u koncentraciji  $10^{-4}$ M, MINA u koncentraciji  $10^{-2}$ M i PAM-2 Cl u koncentraciji  $10^{-4}$ M i zadržani u posudi za izolovane organe 10—40 min radi posmatranja njihovog efekta. Zatim su pojedinačno dodavani holinolitik metilatropin u koncentraciji  $10^{-5}$ M.

#### REZULTATI

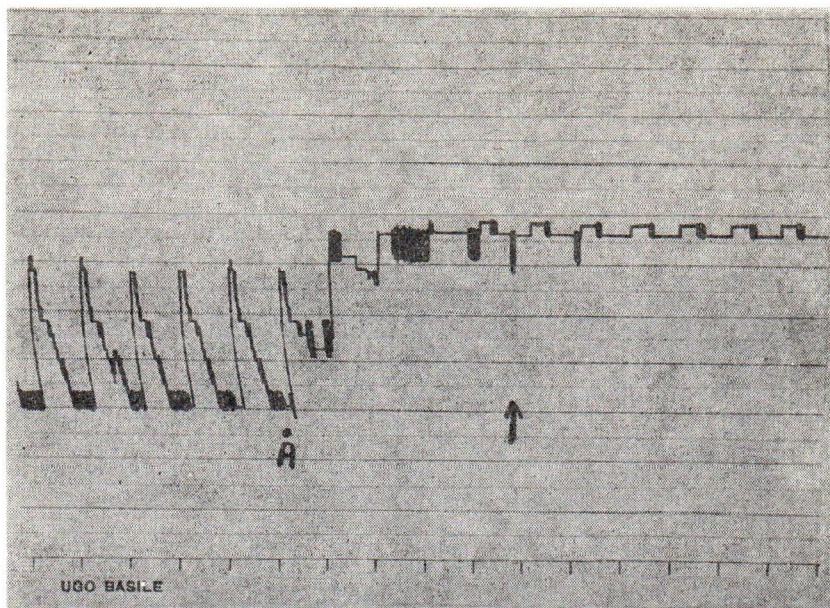
##### 1. Efikasnost amitona

Konstantni električni stimuli gastričnih nerava izazivaju ravnomerne kontrakcije longitudinalne muskulature izolovanog mišjeg želuca, a vide se na slici 1. do tačke A.

Kada se posle 4—5 ravnomernih kontrakcija muskulature izolovanog želuca odjednom infundira amiton u koncentraciji  $10^{-5}$  (sl. 1. A) dolazi nakon 1—2 min do snažnog povećanja motornih efekata holinergičnog nerva, tj. tonus fundusa želuca se naglo povećava, spazam želuca je sve intenzivniji, a izazvane električne kontrakcije se smanjuju. Ovaj efekat amitona ostaje nepromenjen i nakon ispiranja organa, tj. nema relaksacije izolovanog želuca i vraćanja tonusa ka bazalnoj liniji.

##### 2. Efikasnost oksima nakon otrovanja želuca amitonom

Posle postignutog efekta amitona injiciran je naglo morfolinijum oksim u koncentraciji  $10^{-4}$ M. Ovaj oksim nije doveo do potpunog »funk-



Sl. 1. Kontrolne kontrakcije (do tačke A). Tačka A označava vreme dodavanja amitona, što rezultira u pojačanom tonusu i smanjenju kontrakcija koji su ostali nepromenjeni i nakon ispiranja (strelica)

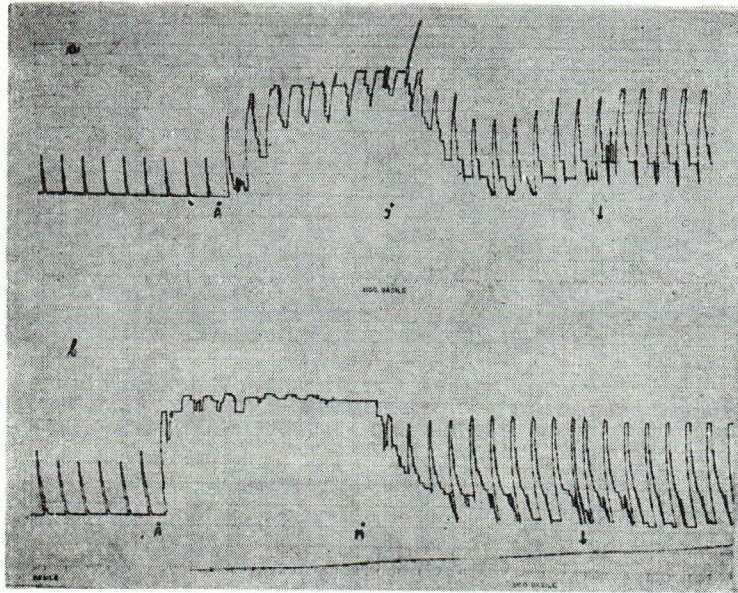
cionalnog oporavljanja» želuca, tj. nije trajno vratio tonus na početne vrednosti, a posle ispiranja tonus fundusa želuca ponovo se diže ka vrednostima koje je ispoljio amiton (sl. 2a).

Ukoliko smo umesto morfolinijum oksima pojedinačno infundirali MINU u koncentraciji  $10^{-2}M$  ili PAM-2 Cl u koncentraciji  $10^{-4}M$ , onda su oba ova oksima ispoljila snažan efekat i vratila tonus izolovanog želuca na kontrolne vrednosti. Ovaj efekat je trajan i potpun jer se zadržava i posle ispiranja organa tako da je »funkcionalno oporavljanje« intoksiciranog želuca potpuno i trajno (sl. 2b)

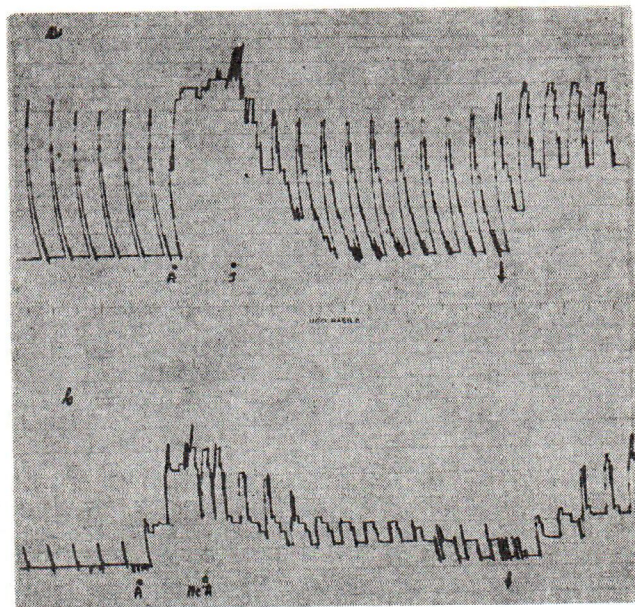
### 3. Efikasnost spazmolitika nakon otrovanja želuca amitonom

Nakon postignutog izraženog efekta amitona odjednom je injiciran metilatropin u koncentraciji  $10^{-7}M$  (sl. 3b). Ovaj holinergični blokator je vratio tonus želuca na kontrolne vrednosti, ali se njegov efekat posle ispiranja želuca nije zadržao, već se tonus fundusa naglo podigao do visine koju je izazvao amiton.

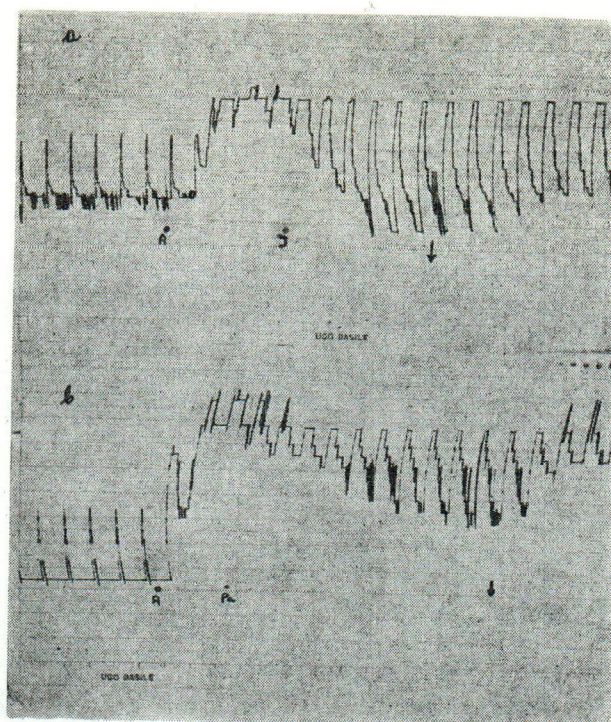
Ukoliko je umesto metilatropina injiciran papaverin u koncentraciji  $10^{-5}M$  (sl. 4b), ovaj glatkomišićni relaksator je neznatno spustio tonus fundusa želuca čiji se efekat posle ispiranja vrlo brzo vratio na vrednosti dobijene od strane amitona.



Sl. 2. a) Kontrolne kontrakcije (do tačke A). Tačka A označava injiciranje amitona, a tačka J injiciranje morfolinijum oksima. Efekat ispiranju označen je strelicom  
b) Sve isto kao pod a), samo što tačka M označava injiciranje MINE



Sl. 3. a) Kontrolne kontrakcije (do tačke A). Tačka A označava injiciranje amitona, a tačka J injiciranje morfolinijum oksima. Efekat ispiranja označen je strelicom  
 b) Sve isto kao pod a), samo što tačku MeA označava injiciranje metil-atropina



Sl. 4. a) Kontrolne kontrakcije (do tačke A). Tačka A označava injiciranje amitona, a tačka J injiciranje morfolinijum oksima. Efekat ispiranja označen je strelicom

b) Sve isto kao pod a), samo što tačka Pa označava injiciranje papaverina

#### DISKUSIJA

Izolovani želudac miša upotrebljen kao modelni sistem poslužio je za analiziranje efekata električne stimulacije pripadajućih nerava, amitona, nekih oksima, jednog holinolitika i jednog spazmolitika. Izolovani organ se ravnomerno kontrahuje dejstvom električnih stimulusa. Amiton izaziva naglo povećanje tonusa fundusa želuca i vrlo brzo dovodi do totalnog spazma.

Iako je ovaj inhibitor holinesteraze otrovniji od somana, holinesteraza inhibisana njime brzo se reaktivira. Ovo nam potvrđuju upotrebljeni oksimi MINA i PAM-2 Cl koji su za kratko vreme doveli do potpunog »funktionalnog oporavljanja« intoksiciranog želuca, tj. vratili i tonus i visinu izazvanih kontrakcija na kontrolne vrednosti. Njihov efekat je trajan i potpun jer se zadržava i nakon ispiranja organa.

Danas je, kao reaktivator inhibisane holinesteraze veoma aktuelan bispiridinski oksim morfolinijumske strukture koji su sintetizovali japanski stručnjaci i označili brojem XIII. Prema *Binenfeldu* i saradnicima (10) ovaj oksim ima bolju zaštitnu moć od PAM-2 Cl i Toksogonina. U našim eksperimentima ovaj oksim je ispoljio samo spazmolitički efekat sličan metilatropinu i papaverinu i nije doveo do »funkcionalnog oporavljanja« otrovanog želuca, što govori da on ne deluje indirektno reaktivatorski.

#### ZAKLJUČAK

U našim eksperimentima amiton je snažno povećao efekat električne stimulacije holinergičnih nerava želuca koji su doveli do spastičnih kontrakcija, a u izvesnim slučajevima nastupio je i totalan spazam.

Relativatori MINA i PAM-2 Cl upotrebljeni u ovim eksperimentima antagonizuju efekat amitona i dovode do potpunog »funkcionalnog oporavljanja« otrovanog želuca. Oporavljanje je trajno.

Morfolinijum oksim (bispiridinski oksim), na izolovanom mišjem želuca posle otrovanja amitonom deluje samo spazmolitički. Ovo delovanje verovatno nije indirektno na reaktivaciju enzima jer mu je spazmolitički efekat identičan sa efektima upotrebljenog holinolitika metilatropina (kompetitivni antagonist muskarinskih efekata acetilholina) i spazmolitika papaverina.

#### Literatura

1. *Davies, D. R., Green, L. A.*: Brit. J. Med., 16 (1959) 128.
2. *Fleisher, J., Mishel, H., Yates, L., Harrison, C.*: J. Pharmacol. Exp. Therap., 129 (1960) 31.
3. *Kevitz, H., Wilson, I., Nachmansohn, D.*: Arch. Biochem., 64 (1956) 456.
4. *Wilson, I., Sondheimer, F.*: Arch. Biochem. Biophys., 64 (1956) 456.
5. *Huković, S., Bubić, I.*: Acta Med. Iug., 17 (1963) 300.
6. *Huković, S., Rand, J., Vanov, S.*: Brit. J. Pharmacol. Chemother., 24 (1965) 178.
7. *Paton, W. D. M., Vane, J. R.*: J. Physiol., 165 (1963) 10.
8. *Huković, S., Begić, M., Radičević, M.*: Akademija nauka i umjetnosti BiH, 40 (1970) 111.
9. *Burn, J. H., Rand, M. J.*: J. Physiol., 150 (1960) 295.
10. *Binenfeld, Z., Gumhalter, Ž., Bošković, B.*: VI kongres farmaceuta Jugoslavije, Sarajevo 1972, E-13.

*Summary*THE EFFICIENCY OF REACTIVATORS AND SPASMOLYTICS  
AFTER AMITONE POISONING IN VITRO

The paper deals with the action of amitone, an organophosphorus cholinesterase inhibitor, some reactivators (morpholinium oxime, Mina and PAM-2 Cl), methylatropine (a cholinolytic) and papaverine (a spasmolytic) on isolated mouse stomach. Amitone was found to produce a strong spastic effect. The oximes MINA and PAM-2 Cl infused in the vessel for isolated organs after amitone poisoning removed the spasm and returned contractions to their initial values. The functional recovery of the intoxicated organ was permanent and complete. The effect produced by morpholinium oxime was only spasmolytic, probably directly on receptors, and not an indirect, reactivating effect. The spasmolytic effect of this oxime was identical to the effects of methylatropine and papaverine.

*Institute of Pharmacology and  
Toxicology, School of Veterinary Medicine, Sarajevo*      *Received for publication  
October 30, 1975*