

PROMENE AKTIVNOSTI ACETILHOLINESTERAZE
U KORI MOZGA MIŠEVA TROVANIH SA VX
OTROVOM I IZLOŽENIM PRODUŽENOM
DEJSTVU HIPEROKSIČNE SREDINE

R. C. J o v i ć

*Neuropsihijatrijska bolnica, Kovin
(Primljeno 30. X 1975)*

U eksperimentima na miševima pokazano je da produžena oksigenacija intaktnih i otrovanih belih miševa povećava normalnu aktivnost i stimuliše regeneraciju inhibisane acetilholinesteraze u isečcima kore mozga ovih životinja. Mehanizam stimulantnog dejstva O₂ na aktivnost AChE mozga životinja i oporavak miševa otrovanih letalnim dozama VX-otrova diskutovan je u ovom radu, ali nije efikasan. Nužna su dalja istraživanja vrednosti oksigenoterapije u odnosu na osnovni antiholinesterazni mehanizam dejstva organskofosfornih jedinjenja u prvom redu iz praktičnih razloga, ali se ne sme zapostaviti ni akademski značaj takvih fundamentalnih istraživanja.

Eremeev i Trošihin (1) pokazali su da visoke koncentracije kiseonika u vazduhu koji udišu eksperimentalne životinje u toku 10 do 30 dana, prouzrokuju značajne promene u aktivnosti AChE mozga. Jedna od hipoteza u ranijem radu sa somanom (2) bila je da bi karbogen ili čisti kiseonik mogao da ubrza regeneraciju AChE i oslabi njenu vezu s organskofosfornim jedinjenjima te olakša reaktivatorski efekat oksima. Međutim, rezultati akutnih eksperimenata i *in vivo* i *in vitro* nisu potvrdili ovu hipotezu.

U subakutnom eksperimentu opisanom u ovom radu, istraživana je, iz praktičnih razloga, vrednost oksigenoterapije u odnosu na inhibisanu AChE mozga životinja otrovanih O-etil-S-(2-diizopropil-aminoetil) metil-tiofosfonatom (VX).

MATERIJAL I METODE

Životinje: U eksperimentima su upotrebljeni beli miševi oba pola, telesne težine 22-23 g nabavljeni sa farme VMA.

Supstancije: O-etil-S-(2-diizopropil-aminoetil) metiltiofosfonat 98—99%—tne čistoće, sintetizovan je u laboratoriji. Osnovni 1%—tni rastvor otrova u izopropilnom alkoholu pravljen je *ex tempore*. Daljnja potrebna razređenja pravljen su u fiziološkom rastvoru neposredno pre injiciranja. Koncentracija je bila takva da se potrebna doza nalazila u volumenu od 10 ml/kg telesne težine miša. Atropin sulfat bio je komercijalni preparat »Vetseruma« u obliku praška. Rastvoren je u odgovarajućoj koncentraciji u 0,9%—tnom NaCl tako da je pri i. p. aplikaciji volumen iznosio 10 ml/kg. PAM-2-Cl (piridin-2-aldoksim metilhlorid) u obliku kristalnog praška, sintetizovan je u laboratoriji. Otapan je u 0,9%—tnom NaCl i apliciran i. p. kao i atropin. Od mešavina gasova upotrebljeni su karbogen (95% O₂ + 5% CO₂) i mešavina kiseonika i azota (60% O₂ + 40% N₂). Ovi gasovi dobavljeni su iz preduzeća za proizvodnju medicinskih gasova u Rakovici u čeličnim bocama i pod pritiskom od 150 do 200 atmosfera. Supstrat za merenje aktivnosti holinesteraze bio je acetilholinhlorid u ampulama, proizvod »Plive« Zagreb.

Tretman životinja: U pokus smo uzeli četiri grupe miševa. Prva je grupa imala tri podgrupe od po 36 miševa, a ostale grupe po dve podgrupe od po 36 miševa.

I. grupa: Miševi podgrupe A držani su u hermetički zatvorenom sistemu u atmosferi karbogenic sa stalnom izmenom gasova. Posle 2 časa oksigenacije 6 miševa je žrtvovano, izvađen je mozak i određena je aktivnost AChE u isečcima kore mozga i u krvi. Isti je postupak sproveden na po 6 miševa posle 4 i posle 8 časova. Preostalih 18 miševa oksigenisano je svaki dan po 3 časa. Posle 7, 15 odnosno 30 dana žrtvovano je po 6 miševa i određena je aktivnost AChE u mozgu.

Druga podgrupa (B) držana je u komori kroz koju je proticala mešavina od 60% O₂ i 40% N₂. Po 6 životinja žrtvovano je posle 2, 4 i 8 časova odnosno posle 7, 15 i 30 dana i izmerena je aktivnost AChE u mozgu.

Treća je podgrupa (C) služila za kontrolu i držana je pod normalnim uslovima u priručnoj štalici. Posle 2, 4 i 8 časova, odnosno 7, 15 i 30 dana žrtvovano je po 6 miševa i određena je aktivnost AChE u isečcima kore mozga, u istim vremenima kada i životinjama iz podgrupe A i B.

II. grupa: Svim je miševima injicirano supkutano 0,6 x LD₅₀ doze VX otrova (10,2 μg/kg). Podrupa (A) od 36 miševa držana je u atmosferi karbogenic 2, 4 i 8 časova, odnosno po 3 časa svaki dan u trajanju od 7, 15, odnosno 30 dana, posle potkožne injekcije otrova. Miševi iz podgrupe (B) čuvani su posle injekcije otrova u priručnoj štalici. Iz

svake podgrupe (A i B) po 6 miševa žrtvovano je posle 2, 4 i 8 časova, odnosno 7, 15 i 30 dana i određena je aktivnost AChE u isečcima kore mozga.

III. grupa: Svim je životinjama ove grupe injiciran atropin sulfat (10 mg/kg, i. p.) 10 minuta pre VX-otrova (1,3 x LD₅₀, tj. 22,3 µg/kg s. c.). Prva je podgrupa (A) držana u atmosferi karbogene po 2, 4, 8 časova, odnosno po 3 časa svaki dan do 7, 15 i 30 dana, a druga (B) držana u sobnim uslovima i služila je kao kontrola. Iz obe je podgrupe po 6 miševa žrtvovano posle 2, 4 i 8 časova, odnosno 7, 15 i 30 dana i određena je aktivnost AChE u isečcima kore mozga.

IV. grupa: Životinje su injicirane sa 1,3 x LD₅₀ dozom VX-otrova, tj. 22,3 µg/kg sc. i istovremeno ili 1-2 minuta kasnije štice sa PAM-2-Cl (50 mg/kg i. p.). Životinje iz podgrupe A i B tretirane su kao i odgovarajuće podgrupe III grupe.

Aktivnost acetilholinesteraze: U isečcima kore mozga (prosečne debljine 0,35 mm i težine 30-50 mg) aktivnost je enzima merena standardnom manometrijskom metodom u Warburgovom aparatu uz 0,01 M koncentraciju supstrata acetilholinhlorida (3). Enzimska aktivnost izražena je u molima hidrolizovanog acetilholina na 1 g svežeg tkiva u toku 60 minuta.

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni primenom Studentovog t-testa.

REZULTATI

Efekti različitih koncentracija kiseonika u vazduhu na aktivnost acetilholinesteraze u mozgu intaktnih miševa

Aktivnost acetilholinesteraze u isečcima kore mozga miševa praćena je u 3 podgrupe životinja koje su održavane u atmosferi što je sadržavala različite koncentracije kiseonika: 95% O₂ (A), 60% O₂ (B) i 20% O₂ (C) – sobni uslovi.

Rezultati ovih pokusa izneseni su u tablici 1.

Kao što se vidi iz podataka datih u tablici 1, u akutnom eksperimentu, držanje intaktnih životinja u atmosferi bogatoj kiseonikom (60% odnosno 95%) od 2 časa do 7 dana nema značajnijih promena u aktivnosti AChE mozga. Međutim, u životinja koje su svaki dan u toku 14, odnosno 30 dana izlagane po 3 časa atmosferi bogatoj kiseonikom, dolazi do statistički značajnog porasta aktivnosti AChE u kori mozga zdravih, netretiranih životinja. Ovo povećanje aktivnosti enzima iznosi od 11% do 35% iznad normalnih vrednosti izmerenih u podgrupi kontrolnih životinja. Ovaj nalaz, koji je u punoj saglasnosti s podacima iz literature (1) bio je povod da postavimo oglede u kojima bismo ispitali efekte hiperoksigenacije u otrovanih i u otrovanih ali štice eksperimentalnih životinja, a o čemu u literaturi nema podataka.

Tablica 1

Efekti različitih koncentracija kiseonika u atmosferi na aktivnost AChE mozga intaktnih miševa (date su srednje vrednosti od 6 životinja $X \pm SD$)

Vreme žrtvovanja	m mol ACh/g/čas ($X \pm SP X$)		
	Karbogen (95% O ₂ — 5% CO ₂) (A)	(60% O ₂ — 40% N ₂) (B)	Atmosferski vazduh (kontrola) (C)
2 časa	92,1 ± 1,96	91,3 ± 2,10	89,4 ± 2,31*
4 „	91,7 ± 2,44	90,5 ± 3,02	88,6 ± 2,42
8 „	90,3 ± 1,84	88,8 ± 1,56	86,9 ± 1,94
7 dana	96,3 ± 2,15	91,4 ± 2,04	87,5 ± 2,31
15 „	103,6 ± 2,21*	97,4 ± 2,10	87,2 ± 1,77
30 „	117,6 ± 2,29**	103,5 ± 3,10*	86,9 ± 2,41

* p < 0.01 ** p < 0.001.

Efekti karbogena na aktivnost AChE u kori mozga miševa otrovanih različitim dozama VX-otrova i štice-nih atropinom i pralidoksimom

U ranijim akutnim ogledima ispitani su efekti 6-časovne ekspozicije karbogenu na aktivnosti AChE u isečcima kore mozga otrovanih i štice-nih miševa.

Rezultati su prikazani u tablici 2.

Tablica 2

Efekat hiperoksigenacije (karbogen kroz 6 časova) na aktivnost AChE u mozgu otrovanih i štice-nih miševa (svaka brojka predstavlja srednju vrednost od po 6 životinja $X \pm SD$)

Tretman životinja		m mol ACh/g/čas		Inhibicija %	
		karbogen (A)	kontrola (B)	(A)	(B)
1. NaCl	0,9%	91,1 ± 2,06	87,0 ± 1,84	—	—
2. VX otrov	10,2	31,7 ± 0,74	30,6 ± 2,15	64,8	64,9
(μg/kg)					
3.	17,2	19,4 ± 0,63	18,5 ± 0,84	77,7	78,8
4.	22,3	0,8 ± 0,19	8,4 ± 0,23	88,8	90,4
5. VX otrov	22,3 μg/kg +	15,8 ± 0,88	16,0 ± 0,63	81,9	81,7
Atropin	10 μg/kg				
6. VX otrov	22,3 μg/kg +	36,7 ± 0,65	31,8 ± 1,04	59,0	63,5
Pralidoksim	50 μg/kg				

Kao što se vidi iz navedenih rezultata, hiperoksigenacija u trajanju od 6 časova ne utiče na aktivnost AChE mozga kontrolnih i otrovanih, odnosno štíćenih životinja. Zapravo, stepen inhibicije AChE u životinja držanih u normalnim uslovima (u sobi) i u životinja koje su izlagane atmosferi karbogene u trajanju od 6 časova približno je jednak. Međutim, u miševa koji su otrovani subletalnom dozom VX-otrova pa oksigenisani karbogenom svakog dana po 3 časa u trajanju od 30 dana, dobijene su značajne razlike u aktivnosti AChE mozga u odnosu na kontrolnu grupu životinja koje su istom dozom VX-otrova injicirane pa držane u sobnim uslovima 30 dana. Rezultati ovih istraživanja prikazani su u tablici 3.

Tablica 3

Aktivnost AChE mozga kontrolnih i oksigenisanih miševa ($X \pm SD$) u toku 30 dana posle potkožne subletalne doze VX-otrova. $N = 6$.

Tretman	Vreme žrtvovanja	m mol (ACh/g/h)		A : B p <
		Karbogen (A)	Kontrola (B)	
NaCl 0,9%	8 čas.	91,1 ± 2,06	87,0 ± 1,84	n s
	2 „	33,2 ± 0,71	31,4 ± 1,15	n s
VX otrov (10,2 µg/kg s. c.)	4 „	34,4 ± 1,08	32,5 ± 1,36	n s
	8 „	31,3 ± 1,24	38,5 ± 1,43	n s
	7 dana	69,9 ± 2,09	55,4 ± 2,10	0,01
	15 „	99,8 ± 2,41	86,6 ± 1,98	0,01
	30 „	121,3 ± 3,16	88,5 ± 2,74	0,001

Kao što se vidi iz podataka iz tablice 3, hiperoksigenacija ubrzava oporavak aktivnosti inhibisane AChE mozga u poređenju sa kontrolnim životinjama. Pored toga, spontana reaktivacija inhibisane AChE u kontrolnih životinja postiže se relativno brzo (posle 10 dana), ali enzimska aktivnost ne prelazi vrednost dobijenu u neotrovanih životinja. U grupi otrovanih i oksigenisanih životinja 30 dana posle injekcije otrova, nivo aktivnosti AChE mozga viši je za otprilike 34% u odnosu na normalnu aktivnost pre trovanja iste grupe životinja kao i u odnosu na kontrolnu grupu životinja u isto vreme u ovim ogledima. U ovim eksperimentima pokazano je statistički značajno stimulativno dejstvo karbogene na regeneraciju i povišenje aktivnosti AChE u kori mozga miševa.

Slični ogledi su izvedeni na miševima koji su injicirani letalnom dozom VX-otrova (1,3 x LD₅₀, tj. 22,3 µg/kg, s. c.) i štíćenih atropin sulfatom (10 mg/kg, i. p., 10 min pre otrova) odnosno pralidoksimom (50 mg/kg, i. p., istovremeno ili 1-2 min. posle otrova). Rezultati ovih ogleda pokazani su u tablici 4.

Tablica 4

Efekti karbogena na spontanu i pralidoksimom indukovanu regeneraciju aktivnosti AChE mozga miševa ($X \pm SD$) otrovanih letalnom dozom VX-otrova. $N = 6$.

Aplikacija	Vreme žrtvovanja	m mol ACh/g/čas		A—B	A : B p <
		Karbogen (A)	Kontrola (B)		
NaCl 0.9%	8 h	91,1 + 2,06	87,0 + 1,84	4.1	n. s.
VX otrov	2 h	12,6 ± 0,66	10,5 ± 0,33	2.1	n. s.
(22.2 µg/kg s. c.)	4 h	9,9 ± 0,49	9,8 ± 0,39	0.1	n. s.
+	8 h	10,7 ± 0,32	8,8 ± 0,24	1.9	n. s.
Atropin	7 dana	56,6 ± 1,94	39,1 ± 1,74	20.5	0.001
(10 mg/kg i. p.)	15 „	88,3 ± 2,34	69,5 ± 1,98	18,8	0.001
	30 „	108,5 ± 2,73	81,9 ± 2,33	26,6	0.001
VX otrov	2 h	35,7 ± 1,65	30,8 ± 1,63	4,9	n. s.
(22.3 µg/kg s. c.)	4 h	41,9 ± 1,28	33,6 ± 0,98	8,3	n. s.
+	8 h	57,5 ± 1,31	69,3 ± 1,94	19.1	0.001
Pralidoksim	7 dana	88,4 + 2,06	69,3 + 1,94	19.1	0.001
(50 mg/kg i. p.)	15 „	102,5 + 1,95	86,9 + 2,34	15.6	0.010
	30 „	127,4 + 2,71	88,6 + 2,47	38,8	0.001

Izvesni eksperimentalni podaci pokazuju da hiperoksigenacija životinja otrovanih letalnom dozom VX-otrova statistički značajno ubrzava spontanu reaktivaciju inhibisane AChE mozga i da stimuliše pralidoksimom indukovanu reaktivaciju ovoga enzima samo u fazi oporavka životinja, počev od 7 dana posle aplikacije otrova.

U akutnoj fazi trovanja, do 8 časova posle injekcije otrova karbogen ne utiče na spontanu reaktivaciju inhibisane AChE mozga, ali ublažuje znake trovanja u miševa. Međutim, karbogen značajno ubrzava pralidoksimom indukovanu reaktivaciju AChE mozga miševa posle 8 časova oksigenacije. Najzad u obe grupe životinja, koje su oksigenisane 15 do 30 dana posle trovanja nivo aktivnosti AChE je viši za oko 10 do 40% u odnosu na normalnu aktivnost AChE mozga netretiranih životinja.

DISKUSIJA

U našim ranijim istraživanjima (2) pokazano je da oksigenoterapija primenjena sistemom komora za male životinje odnosno veštačkim disanjem u mačaka, povećava terapijski učinak holinolitika, održava adekvatnu oksigenaciju krvi i posle izrazitih hemodinamskih poremećaja prouzrokovanih organskofosornim jedinjenjima u eksperimentalnih životinja. Pored toga, oksigenoterapija poništava sve hipoksične poremećaje EKG-a u otrovane mačke, podiže krvni pritisak, ubrzava spon-

tani oporavak životinja otrovanih višestruko smrtonosnim dozama so- mana, sprečava ili poništava metabolitične poremećaje u tkivima otro- vanih životinja i čuva energetske rezerve (4). Međutim, u akutnim eks- perimentima mi nismo mogli potvrditi svoju hipotezu da će oksigenote- rapija uticati na čvrstinu veze organskofosforno jedinjenje-holinestera- za, sprečiti brzo starenje tog kompleksa i omogućiti bržu i potpuniju spontanu i oksimima indukovanu regeneraciju enzimske aktivnosti. Na taj način poboljšala bi se i efikasnost klasične i specifične terapije tro- vanja organskofosfornim jedinjenjima.

Eremeev i Trošihin (1) pokazali su da u intaktnih belih miševa, posle produženog izlaganja životinja u atmosferi bogatoj kiseonikom, dolazi do povišenja aktivnosti AChE u moždanom tkivu iznad normalnih vred- nosti dobijenih na grupi životinja koje su držane 10 odnosno 30 dana u laboratorijskim uslovima. U ovom radu mi smo ponovili oglede rus- kih autora i dobili veoma slične ili čak identične rezultate o stimula- tivnom dejstvu karbogena na aktivnost AChE kore mozga intaktnih miševa (vidi tablicu 1). Posle toga izveli smo čitav niz novih oglada na životinjama tretiranim VX-otrovom, atropin sulfatom i pralidoksimom. Smatrali smo da upravo taj deo istraživanja, pored akademskog može da ima i praktični značaj u terapiji trovanja organskofosfornim jedi- njenjima.

Nađeno je da karbogen (95% O₂ + 5% CO₂) ne utiče na normalnu aktivnost, stepen inhibicije VX-otrovom, ni na regeneraciju AChE u prvih 8 časova (akutni eksperiment). Možda jedini izuzetak ovde čini podatak da u životinja koje su otrovane letalnom dozom VX-otrova i istovremeno štićene pralidoksimom, već posle 8 časova oksigenacije do- lazi do znatno brže i kvantitativno veće regeneracije AChE u odnosu na kontrolnu grupu životinja. U svakom slučaju produžena oksigenacija ovih životinja kroz 7, 15 i 30 dana, uslovlila je statistički značajan sti- mulativni efekt karbogena na normalnu spontanu i pralidoksimom in- dukovanu regeneraciju AChE aktivnosti.

Na osnovu ovih rezultata eksperimentalnog rada i veoma oskudnih literaturnih podataka teško je objasniti mehanizam ovih efekata kise- onika na aktivnost AChE. Činjenica je da karbogen nema gotovo ni- kakav uticaj na aktivnost AChE krvi životinja u kojih smo našli zna- čajnu stimulaciju aktivnosti AChE u mozgu (u ovom radu nisu dati ti podaci). To znači da je efekat kiseonika selektivan za nervno tkivo, i to isključivo u eksperimentima *in vivo*. Otuda se nameće pretpostavka o promeni stanja ekscitabilnosti nervnog tkiva i narušavanje odnosa u sistemu ACh-AChE pod dejstvom povećane sadržine kiseonika u krvi i nervnom tkivu. Poznato je da holinolitici, kao simptomatska sredstva lečenja trovanja organskofosfornim jedinjenjima, kompetitivnim dej- stvom na holinergetičke receptore u CNS-u sa acetilholinom, uzrokuju funkcionalnu inhibiciju nervnog tkiva i zaštitu životinja.

Isto tako je opšte poznato da povišena koncentracija kiseonika u udahnutom vazduhu smanjuje ekscitabilnost centara u mozgu. Možda

upravo taj depresivni efekat kiseonika na moždano tkivo uslovljava smanjenu sintezu ACh i aktivaciju AChE koju nalazimo u našim ogle-
dima.

U prilog ovoj hipotezi mogu se navesti eksperimentalni podaci da je u životinja koje su injicirane letalnom dozom VX-otrova i štice-
ne pralidoksimom, dobijena veoma brza i potpuna regeneracija inhibisane
AChE u mozgu iako se zna (6) da oksimi veoma slabo prodiru kroz he-
mato-encefaličnu barijeru u CNS da bi tamo ispoljili reaktivatorski
efekat.

Dalja istraživanja mehanizma stimulantnog dejstva kiseonika na ak-
tivnost AChE u mozgu i oporavak životinja otrovanih organskofosfor-
nim jedinjenjima nužna su i neophodno potrebna kako sa akademskog
stanovišta tako i iz praktičnih razloga radi poboljšanja efikasnosti te-
rapije trovanja antiholinesteraznim supstancijama.

Literatura

1. *Eremeev, N. S., Trošilin, G. B.*: Dokl. Akad. Nauk, 174 (1967) 148.
2. *Jović, C. R.*: Vrednost oksigenoterapije u eksperimentalnom trovanju so-
manom, doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Beograd (1971).
3. *McIlwain, H., Rodnight, R.*: Practical Neurochemistry, Churchill, London,
1962, str. 219.
4. *Jović, C. R.*: Vojnosanit. pregl., 29 (1972) 134.
5. *Jović, C. R., Bachelard A. S., Clark, A. G., Nicholas P. C.*: Biochem. Pharma-
col., 20 (1971) 519.
6. *Milošević, M., Anđelković, D.*: Nature, 210 (1966) 206.

Summary

BRAIN CHOLINESTERASE ACTIVITY CHANGES IN MICE TREATED WITH O-ETHYL-S-(2-DIISOPROPYL-AMINOETHYL) METHYL THIOPHOSPHONATE (VX) AND EXPOSED TO HIGH OXYGEN CONCENTRATIONS IN THE AIR

The effect of the length of exposure to high oxygen concentrations on ace-
tylcholinesterase activity has been studied in the cortical slices of normal
and VX poisoned mice. An 8-hour exposure had no effect on enzyme activity
in either group of mice, regardless of whether they were protected with
oximes or not. However, the mice exposed to high oxygen concentrations for
15 to 30 days showed a considerably higher AChE activity as compared with
controls. This was clearly shown even in intact mice whose brain cholinesterase
activity was 10 to 40 percent higher than in intact mice kept in the normal
atmosphere.

In the mice protected with oximes enzyme reactivation was somewhat
faster than in controls.

It is concluded that a high oxygen concentration in the breathing air may
cause an increase in AChE activity in intact animals and stimulate both the
spontaneous and oxime induced enzyme reactivation in VX poisoned mice.

Neuropsychiatry Hospital,
Kovin

Received for publication
30th October 1975.