

REAKTIVACIJA FOSFORILHOLINESTERAZE
U KORI MOZGA PACOVA POSLE
PARENTERALNE PRIMENE PRALIDOKSIMA
(PAM-2) I TOKSOAGONINA (LüH-6)

D. ANDELKOVIĆ i M. MILOŠEVIĆ

Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Beograd

(Primljeno 14. XII 1965)

Na osnovu nedavno dokazanog selektivnog afiniteta pralidoksima (PAM-2) za pojedine regije mozga, pretpostavili smo da se reaktivacija holinesteraze inhibirane organofosfatima može dokazati jedino merenjem enzimске aktivnosti pojedinih isečaka a ne homogenata mozga. U nizu eksperimenata na pacovima trovanim paraoksonom i tretiranih zatim pralidoksimom, odnosno toksogoninom (LüH 6), pokazalo se da je aktivnost holinesteraze u kori velikog mozga bila doista znatno veća od one u životinja koje su primile samo inhibitor. Diskutirani su i objašnjeni suprotni rezultati različitih autora o reaktivatorskoj moći pralidoksima pri otrovanju organofosfatima.

Inhibicija holinesterase (Che) u mozgu uzrokuje niz centralnih simptoma koji čine značajnu komponentu u opštoj kliničkoj slici akutnog trovanja organofosfornim supstancijama. Ti efekti, praćeni odgovarajućim promenama u elektroencefalogramu, mnogo su izrazitiji u trovanju nervnim bojnim otrovima nego u trovanju organofosfornim insekticidima (1). Inhibicija Che u mozgu, posle dugotrajnog unošenja srazmerno malih doza organofosfata, takođe uzrokuje niz psihičkih poremećaja a, katkad, i pojavu paranoidnih i depresivnih reakcija (2, 3, 4).

Dosadašnji pokušaji da se centralni efekti organofosfata spreče primenom pralidoksima (PAM-2) i drugih reaktivatora fosforilholinesteraze dali su različite rezultate. *Kewitz* i *Nachmansohn* (5) su, među prvima, pokazali da srazmerno male doze PAM-2, koje uspešno štite miša od letalnih doza paraoksona, nisu u stanju da uzrokuju značajniji stepen reaktivacije fosforilisane Che u mozgu. Zapažanja pomenutih autora potvrdili su kasnije i mnogi drugi istraživači (opširnije v. *Hobbiger*) (6). Nasuprot tome, *Longo* i sarad. (7) su pokazali da PAM-2 sasvim uspešno sprečava karakteristične elektroencefalografske promene kod zeca otrovanog sarinom. Brzi povratak svesti posle intravenske injekcije PAM-2 kod osoba otrovanih parationom (8, 9, 10), kao i njegovo anti-

konvulzivno dejstvo kod istih osoba (11), ukazuju takođe na centralno dejstvo tog oksima.

Pokušaj da se reaktivatorski efekt PAM-2 eksperimentalno dokaže ostao je dosad bez uspeha, najverovatnije stoga što su gotovo svi autori koji su proučavali reaktivaciju fosforilisane Che u mozgu merili enzimsku aktivnost u homogenatima celokupnog mozga. Takav postupak opravdan je pod uslovom da se PAM-2 *ravnomerno* raspodeljuje u aktivnoj koncentraciji u svim delovima mozga. Nedavna ispitivanja *Firemarka* i sarad. (12) pokazala su, međutim, da se radioaktivno markirani PAM-2 u mozgu pacova koncentriše najvećim delom u kori, dok je u ostalim delovima mozga prisutan u jedva primetnim tragovima. Jasno je, prema tome, da se reaktivacija fosforilisane Che u mozgu, ukoliko postoji, može dokazati samo ako se enzimska aktivnost ispituje u onim regijama mozga koje pokazuju selektivni afinitet prema PAM-2. Ta pretpostavka proverena je u nizu eksperimenata opisanih u ovom radu. Pored PAM-2, ispitan je i jedan od novijih oksima, dihlorid bis-(4-hidroksiiminometil-piridinium-1-metil) etar (*Toxogonin*, Lüh 6), koji, za razliku od PAM-2, dobro prodire u moždano tkivo (13).

MATERIJAL I METODE

Opšti eksperimentalni postupak

U svim ogledima upotrebljeni su beli pacovi (isključivo negravidne ženke) čija je težina iznosila 200 do 250 g.

Sve životinje dobile su prethodno intraperitonealno 10 mg/kg atropin sulfata, a zatim su, dvadeset minuta kasnije, otrovane supkutanom injekcijom paraoksone (0,5 mg/kg). PAM-2 hlorid (20 mg/kg) i Lüh 6 (10 mg/kg) ubrizgani su intravenski 10 minuta posle injekcije paraoksone, tj. u trenutku kad su znaci trovanja bili potpuno izraženi. Životinje su žrtvovane jedan sat posle injekcije oksima. Kontrolne životinje koje su, umesto oksima, dobile istu zapreminu 0,9% rastvora NaCl, žrtvovane su u istom vremenskom periodu. Pored tih, za kontrolu su upotrijebljene još dve grupe životinja: jedna, tretirana samo atropinom i odgovarajućim oksimom (bez paraoksone), i druga, koju su sačinjavale normalne (netretirane) životinje. U svakoj grupi bilo je najmanje 5 životinja.

Spremanje tkivnih isečaka

Neposredno posle žrtvovanja životinje, ceo mozak je brzo izdvojen iz lobanje, pažljivo ispreparisan i dobro opran hladnom destilovanom vodom od ostataka krvi, a odmah potom stavljen je na led. Kortikalni isecci sa dorzalne strane cerebralnih hemisfera (parijetalna regija) uzeti su pomoću nožića za brijanje i ohlađenog predmetnog stakla. Svaki isečak tkiva (oko 10 mg svežeg tkiva) odmah je stavljen u glavni deo temperirane Warburgove posudice radi određivanja aktivnosti Che. Na kraju oglada isecci tkiva su izvađeni iz posudice, osušeni na hartiji za

filtriranje, a zatim su stavljeni u toku 24 sata na 110° C, posle čega je određena težina suve supstancije tkiva.

Aktivnost holinesteraze

Aktivnost Che merena je manometrijski u Warburgovom aparatu pri 37°C u sveže spravljenom puferском rastvoru (0,15 M NaHCO₃, 0,164 M NaCl, pH 7,4) u atmosferi 95% azota i 5% CO₂. Kao supstrat upotrebljen je acetilholin hlorid u finalnoj koncentraciji 0,015 M. Enzimсka aktivnost (srednja vrednost od dva merenja) izražena je u μ l CO₂, koji oslobada miligram suve supstancije tkiva u toku 30 minuta po dodavanju supstrata ($\gg Q_{Che}$ vrednost). Dobijene vrednosti korigovane su u pogledu neenzimske hidrolize supstrata. Da bi se isključile eventualne greške koje mogu nastati kao posledica inhibicije i reaktivacije enzimske aktivnosti *in vitro*, aktivnost Che u isečcima mozga kontrolnih i tretiranih životinja određivana je u isto vreme.

REZULTATI

Efekt PAM-2 hlorida

Iz podataka navedenih u tabeli I, vidi se da je aktivnost holinesteraze u kori mozga pacova otrovanih paraoksonom (E 600), jedan sat posle intravenske injekcije srazmerno male doze PAM-2 hlorida, znatno veća nego u cerebralnom korteksu pacova koji su dobili samo paraokson. Ta razlika je statistički značajna ($P < 0,05$). Stepен reaktivacije Che u kori mozga kod otrovanih životinja tretiranih PAM-2 hloridom iznosio je prosečno 54%. Ta vrednost dobijena je prema formuli:

$$\text{Reaktivacija (\%)} = \frac{Q_{Che} (\text{E 600} + \text{PAM-2}) - Q_{Che} (\text{E 600})}{Q_{Che} (\text{kontrolе}) - Q_{Che} (\text{E 600})} \times 100$$

Kod kontrolnih životinja koje su dobile samo PAM-2 i atropin (bez paraoksone), aktivnost Che u kori mozga, jedan sat posle injekcije oksima, bila je na približno istom nivou kao i kod normalnih (netretiranih životinja ($P > 0,05$)).

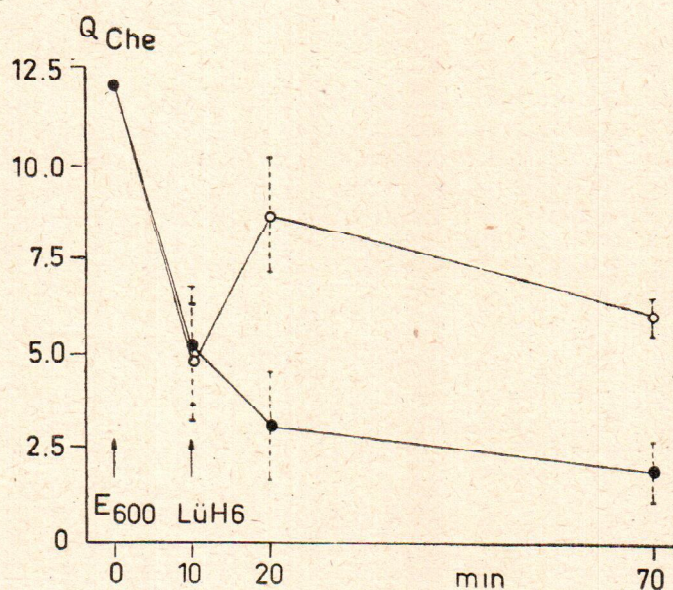
Tablica 1

Aktivnost holinesteraze (Q_{Che}) u kori velikog mozga pacova otrovanog paraoksonom (zaštićenog atropinom), jedan sat posle injekcije PAM-2 hlorida (20 mg/kg, i. v.) Brojevi označavaju srednju (aritmetičku) vrednost, \pm S. E., za najmanje pet životinja.

Tretman (mg/kg)	Q_{Che}	%
Kontrolе	12,45 \pm 0,70	100
Paraokson (0,5)	2,51 \pm 0,71	20
Paraokson (0,5) + PAM-2 (20)	6,60 \pm 1,20	53
PAM-2 (20)	12,45 \pm 0,70	100

Efekt toksogonina (LüH 6)

Na sl. 1 prikazana je prosečna aktivnost Che u kori mozga pacova otrovanih paraoksonom (E 600), 10 i 60 minuta posle intravenske injekcije 10 mg/kg LüH 6. Kao što se vidi, aktivnost Che u kori mozga kod životinja otrovanih paraoksonom (0,5 mg/kg) snižena je već posle 10 minuta na prosečno 40% normalne aktivnosti. Ako se u tom trenutku ubrizga LüH 6, enzimska aktivnost u cerebralnom korteksu se naglo povećava, a zatim postepeno opada, da bi u toku sledećih 60 minuta dostigla nivo koji je još uvek viši od nivoa enzimske aktivnosti u momentu ubrizgavanja oksima. Nasuprot tome, kod otrovanih životinja koje su 10 minuta posle injekcije paraoksiona, umesto LüH 6, dobile istu zapreminu 0,9% rastvora NaCl, aktivnost Che u kori mozga se dalje snižava,



Sl. 1. Efekt intravenske injekcije 10 mg/kg LüH 6 (beli kružići) na aktivnost holinesteraze (C_{he}) u kori velikog mozga pacova otrovanog paraoksonom (E 600, 0,5 mg/kg, sc.) Svaki kružić predstavlja srednju vrednost, \pm S. E. (isprekidane linije), od najmanje 5 životinja. Crni kružići: aktivnost holinesteraze kod otrovanih, netretiranih životinja.

dostižući posle dvadesetak minuta nivo koji iznosi samo 20% normalne enzimske aktivnosti. Praktički, isti nivo enzimske aktivnosti zabeležen je i 70 minuta posle injekcije paraoksona.

Nema sumnje da je prosečna aktivnost Che u kori mozga otrovanih životinja, jedan sat posle injekcije LüH 6 ($Q_{\text{Che}} = 5,67 \pm 0,41$), znatno veća ($P < 0,01$) od prosečne enzimske aktivnosti ($Q_{\text{Che}} = 2,01 \pm 0,71$) kod netretiranih životinja, žrtvovanih u istom vremenskom periodu. Očigledno je, prema tome, da relativno mala doza LüH 6 (10 mg/kg) uzrokuje približno isti stepen reaktivacije inhibisane Che u kori mozga kao i dvostruko veća doza PAM-2.

U pomenutoj dozi, LüH 6 (zajedno sa atropinom) nema značajnijeg efekta na aktivnost Che u moždanoj kori.

DISKUSIJA

Rezultati opisanih eksperimenata pokazuju da pojedinačna injekcija srazmerno malih doza PAM-2 i LüH 6 uzrokuje značajan stepen reaktivacije fosforilisane Che u kori mozga pacova otrovanog letalnom dozom paraoksona. Reaktivatorski efekt, postignut sa LüH 6, potkrepljuje tvrđenje *Erdmanna* (13) da ovaj oksim, dvadesetak puta aktivniji od PAM-2, u terapijski prihvatljivim dozama, relativno dobro prodire u mozak. Činjenica da se isti efekt postiže i primenom PAM-2 nesumnjivo ukazuje da je i koncentracija ovog oksima u kori mozga pacova dovoljna da ispolji jasan reaktivatorski efekt. To, ujedno, pokazuje da radioaktivnost koju su *Firemark* i sarad. (12) zabeležili u kori mozga pacova 10 minuta posle intravenske injekcije 20 mg/kg PAM-2C¹⁴, najverovatnije predstavlja aktivni oblik tog oksima, a ne njegove neaktivne degradacione produkte.

Opisani rezultati stoje u suprotnosti sa opštim uverenjem da PAM-2, zahvaljujući njegovoj kvaternarnoj strukturi, teško prodire u mozak (6). Međutim, takvo shvatanje zasniva se uglavnom na podacima dobijenim u eksperimentima u kojima je reaktivacija fosforilisane Che merena u *homogenatima celokupnog mozga*. Razumljivo je stoga da se takvim postupkom nije mogla zapaziti reaktivacija fosforilisane Che u pojedinim regijama mozga, kao što je, na primer, kora mozga, gde je koncentracija PAM-2, iako znatno manja nego u krvi i perifernim tkivima, ipak znatno veća nego u ostalim delovima mozga (12).

Određivanje aktivnosti Che u *isečcima* tkiva, kao postupak koji je primenjen u ovim ogleđima, pruža, verovatno, izvesno preimućstvo nad uobičajenim merenjem enzimske aktivnosti u homogenizovanom tkivu, s obzirom na to što isećci, za razliku od homogenata, sadrže najveći broj ćelija sa intaktnim ćelijskim membranama. *Koelle* i sarad. (14) su, međutim, pokazali da je Che lokalizovana delom na ćelijskim membranama, a delom u samoj ćeliji. Samo onaj, relativno mali, deo enzima na površini ćelije (tzv. »funktionalna« Che) učestvuje u hidrolizi acetil-

holina, dok intracelularna Che predstavlja neaktivni, »rezervni« deo enzima. Paraokson i drugi liposolubilni organofosfati koji lako prodiru u ćeliju, u podjednako meri inhibišu »funktionalni«, kao i »rezervni« deo enzima. Verovatno je, međutim, da PAM-2, kao kvaternarno jedinjenje azota, koje teško prodire u ćeliju, u većoj meri reaktivira inhibisanu Che na površini ćelije nego u citoplazmi. Pri upotrebi tkivnih isečaka može se stoga očekivati da je sposobnost PAM-2 da reaktivira »funktionalnu« Che veća nego pri upotrebi homogenata tkiva. U poslednjem slučaju najveći broj ćelijskih membrana je razoren, a najveći deo ukupne količine inhibisane Che (oko 95%) čini »rezervna« Che koja je pod normalnim uslovima nedostupna delovanju PAM-2.

U svakom slučaju, zapažena sposobnost PAM-2 da in vitro reaktivira fosforilisanu Che u kori mozga, pruža izvesno objašnjenje za neka njegova centralna delovanja koja su opisana kod životinja i ljudi otrovanih organofosforinim supstancijama (7, 8, 9, 10, 15).

ZAKLJUČAK

U pacova (zaštićenih atropinom) koji su, 10 minuta posle trovanja letalnom dozom paraoksiona, dobili intravenski 20 mg/kg pralidoksima (PAM-2) ili 10 mg/kg toksogonina (LüH 6), aktivnost holinesteraze u kori velikog mozga, jedan sat posle aplikacije oksima, bila je znatno veća nego u životinja koje su dobile sam paraokson.

Dobijeni podaci ukazuju da je u selektivnim regijama mozga moguće postići značajan stepen (oko 40%) reaktivacije inhibisane holinesteraze posle parenteralne primene srazmerno malih doza pomenutih oksima.

ZAHVALE

Zahvaljujemo se Komisiji za medicinsko-naučna istraživanja, Beograd, za materijalna sredstva, prof. dru W. Wirthu, Farbenfabriken Bayer A. G., Leverkusen, za primerak čistog paraoksiona, kao i ing. M. Milojeviću, ITMZ, Beograd, za primerke ispitivanih oksima.

Literatura

1. Grob, D., Harvey, A. M.: *Am. J. Med.*, 14 (1953) 152.
2. Rowentree, D. W., Nevin, S., Willson, A.: *J. Neurosurg. Psychiat.*, 13 (1950) 147.
3. Gershon, S., Shaw, F. H.: *Lancet*, 1 (1961) 1371.
4. Durham, W. F., Wolfe, H. R., Quinby, G. E.: *Arch. environ. Health*, 10 (1965) 55.
5. Kewitz, H., Nachmansohn, D.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 66 (1957) 271.
6. Hobbiger, F.: cit. 14.
7. Longo, U. G., Nachmansohn, D., Bovet, D.: *Arch. int. Pharmacodyn.*, 123 (1960) 282.
8. Namba, T., Hiraki, K.: *J. A. M. A.*, 166 (1958) 1834.

9. Karlog, O., Nimb, M., Poulsen, E.: *Ungeskrift Laeger*, 120 (1958) 177.
10. Schuchter, A., Kawel, H. G., Schneider, J. A.: *Arzneimittel - Forschung*, 10 (1960) 399.
11. Funkes, A. J.: *Arch. environ. Health*, 1 (1960) 404.
12. Firemark, H., Barlow, C. F., Roth, L. J.: *J. Pharmacol.*, 145 (1964) 252.
13. Erdmann, W. D.: *Arzneimittel-Forschung*, 15 (1965) 135.
14. Koelle, G. B. (sub-ed.): *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*, Springer Verlag, Berlin, 1963.
15. Wislicki, L.: *Archt. int. Pharmacodyn.*, 129 (1960) 1.

Summary

REACTIVATION OF PHOSPHORYL CHOLINESTERASE IN THE RAT'S CEREBRAL CORTEX FOLLOWING PARENTERAL APPLICATION OF PRALIDOXIME (PAM-2) AND TOXOGONINE

From the recently proved selective affinity of pralidoxime (PAM-2) to certain areas of the brain it has been assumed that only by measuring the enzymic activity of brain sections and not homogenates reactivation of the cholinesterase inhibited by organophosphorus compounds can be proved. A series of experiments performed on paraoxone poisoned rats treated with pralidoxime and toxogonine (LüH 6) respectively showed a considerably higher cholinesterase activity in the cerebral cortex than in animals which received only the inhibitor.

Contradictory results of various authors on the reactivating property of pralidoxime in organophosphate poisoning are discussed and explained.

*Institute of Pharmacology and Toxicology,
Medical Faculty, Beograd*

*Received for publication
December 14, 1965*