

TERAPIJA OTROVANJA ORGANOFOSFORNIM
SPOJEVIMA S NAROČITIM OSVRTOM
NA PRIMJENU REAKTIVATORA INHIBIRANE
KOLINESTERAZE

KATJA WILHELM

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb**(Primljeno 23. IX 1965)*

Prikazani su osnovni podaci o mehanizmu inhibicije kolinesteraze organofosforinim spojevima kao i o svojstvima inhibiranog enzima. Opširnije je opisan mehanizam reaktivacije inhibirane kolinesteraze, a osobito terapijske mogućnosti koje se danas primjenjuju pri otrovanju tim inhibitorima.

Uporedo s boljim razumijevanjem mehanizma toksičnog djelovanja kojim različiti otrovi ispoljuju svoje učinke raste i broj novih antidota, od kojih su neki izrazito specifični i djelotvorni. Tako je i otkriće prirode biokemijskog oštećenja pri otrovanju organofosforinim spojevima omogućilo pripremu kemijskih antidota iz grupe oksima. Ti spojevi zauzimaju među antidotima naročito mjesto, jer se njihovo terapijsko djelovanje prvenstveno zasniva na reparaciji biokemijske lezije izazvane organofosforinim spojevima.

Toksično djelovanje organofosforinim spojeva temelji se u prvom redu na inhibiciji kolinesteraze. Proces inhibicije dobro je poznat, i danas znamo da se pri reagiranju inhibitora s kolinesterazom stvara fosforilirani enzim. Pokazalo se da na stabilnost fosforiliranog enzima možemo utjecati supstancijama koje imaju nukleofilna svojstva. Zahvaljujući tim svojstvima, mnogi su se oksimi pokazali *in vitro* i *in vivo* kao djelotvorni reaktivatori inhibirane kolinesteraze.

Terapijsko djelovanje nekog oksima zavisi, međutim, ne samo od njegove sposobnosti da reaktivira inhibiranu kolinesterazu, već i od njegove osnovne otrovnosti, brzine postizanja terapijske koncentracije u krvi, te njegove distribucije i perzistencije u organizmu.

Ovaj prikaz sadrži terapijske mogućnosti koje se danas primjenjuju pri otrovanju organofosforinim spojevima i osnovne podatke o mehanizmu inhibicije i reaktivacije kolinesteraze kao i podatke o svojstvima inhibiranog enzima. Prikaz je podijeljen u slijedeća poglavlja:

I Općenito o inhibiciji i reaktivaciji kolinesteraze

1. Hidroliza supstrata
2. Inhibicija
3. Spontana reaktivacija
4. Reaktivacija nukleofilnim reagensima
5. Starenje inhibirane kolinesteraze

II Mehanizam toksičnog djelovanja organofosforinih spojeva i simptomatologija otrovanja

III Terapijske mogućnosti pri otrovanju organofosforinim spojevima

1. Razaranje inhibitora
2. Biološki aktivne supstancije, koje štite kolinesterazu kompetitivnom inhibicijom
3. Supstancije koje sprečavaju sintezu odnosno oslobađanje acetilkolina
4. Supstancije koje blokiraju acetilkolinske receptore
5. Supstancije koje reaktiviraju fosforiliranu kolinesterazu

IV Biološka svojstva oksima i njihova terapijska vrijednost pri otrovanju organofosforinim spojevima

1. Neke fizikalno-kemijske karakteristike oksima
2. Toksičnost oksima
3. Distribucija i ekskrecija oksima
4. Reaktivacija fosforilirane kolinesteraze *in vitro* i *in vivo*
5. Učinci oksima na pojedine simptome otrovanja organofosforinim spojevima
6. Terapijski učinci oksima i atropina pri otrovanju organofosforinim spojevima
7. Terapijsko djelovanje PAM-2 kod ljudi otrovanih organofosforinim spojevima

I OPĆENITO O INHIBICIJI I REAKTIVACIJI KOLINESTERAZE

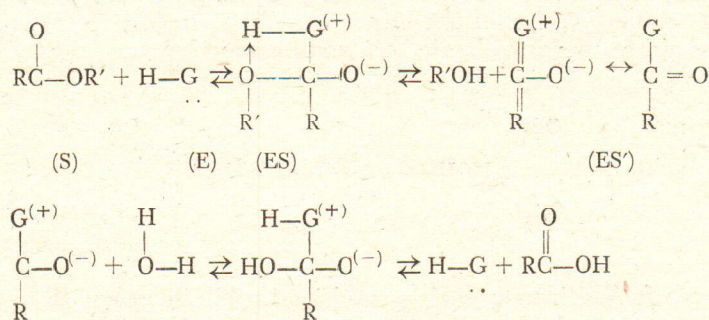
1. Hidroliza supstrata

U metabolizmu acetilkolina sudjeluju dva enzima. To su kolinacetilaza, koja katalizira sintezu acetilkolina, i acetilkolinesteraza, koja katalizira njegovu hidrolizu na kolin i octenu kiselinu (1).

Acetilkinesteraza se nalazi u mozgu i perifernom nervnom sistemu, zatim u mišićima i žlijezdama, a također u stromi eritrocita. Nazivamo je i specifičnom kolinesterazom, jer ima izraziti afinitet za acetilkolin. Pored acetilkolinesteraze postoji u životinjskom organizmu i pseudokolinesteraza, kojom obiluje serum nekih sisavaca a rasprostranjena je u gotovo svim tkivima. Dok je fiziološka funkcija acetilkolinesteraze u nervnom tkivu dobro poznata – ona razgrađuje acetilkolin oslobođen nervnim impulsom – fiziološka funkcija nespecifične kolinesteraze nije razjašnjena kao što nije razjašnjena ni fiziološka funkcija acetilkolinesteraze u eritrocitima.

Aktivni centar acetilkolinesteraze sastoji se od dva dijela: esterskog mjesta na kojem se hidrolizira esterska veza i anionskog mjesta na koje se veže polarni dio molekule supstrata (2, 3, 4, 5). Anionsko mjesto privlači pomoću Coulombovih sila kvarterni dušikov atom acetilkolina i time usmjeruje i fiksira supstrat u položaju koji omogućuje esterskom mjestu da ispolji svoj hidrolitski učinak.

Hidroliza acetilkolina odvija se u nekoliko međustadija, a ti su veza-nje supstrata na enzim, hidroliza estera – uz oslobađanje kolina i vezanje acetilne grupe na bazičnu grupu esterskog mjesta – i, najposlije, hidroliza acetiliranog enzima. Taj se proces, prema *Wilsonu, Bergmannu* i *Nachmansohnu* (6), može prikazati ovim nizom reakcija:



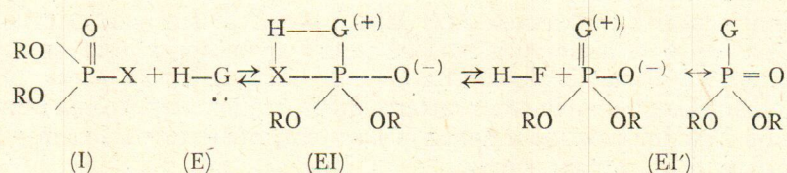
Acetilirani enzim (ES') je vrlo nestabilan i njegovo polovično vrijeme života iznosi tek dio jedne milisekunde (7).

2. Inhibicija

Među kolinesteraznim otrovima razlikujemo reverzibilne i ireverzibilne inhibitore kolinesteraze. Reverzibilni su oni kod kojih se kompleks između inhibitora i enzima disociira uklanjanjem slobodnog inhibitora dijalizom ili na neki drugi način, a to znači da postoji ravnoteža između slobodnog inhibitora i enzima. Kod ireverzibilnih inhibitora inhibicija je progresivna

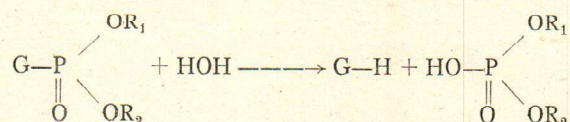
s vremenom i na nju ne možemo utjecati razređivanjem sistema ili uklanjanjem slobodnog inhibitora pomoću dijalize, kao što je to pri inhibiciji reverzibilnim inhibitorima.

Organofosforni spojevi najvažnija su grupa ireverzibilnih antikolinesteraza. Oni inhibiraju kolinesterazu fosforiliranjem aktivnog centra enzima. Proces inhibicije analogan je prije prikazanom procesu hidrolize supstrata (8). Fosforiliranje se vrši na esterskom dijelu aktivnog centra, a proces inhibicije se može prikazati ovim jednačbama (9).



3. Spontana reaktivacija

Fosforilirani enzim EI' može reagirati s vodom na analogan način kao acetilirani enzim (8). Međutim, bitna je razlika između ta dva procesa u tome što proces defosforilacije teče znatno sporije:



Stabilnost fosforiliranog enzima zavisi od alkilnih grupa (R) vezanih na fosfor pa stoga brzina spontane reaktivacije, tj. brzina reagiranja različitih tipova fosforilirane acetilkolinesteraze s vodom, znatno varira. Spontana reaktivacija dimetilfosforilirane kolinesteraze zbiva se brže nego kod bilo kojeg drugog tipa dialkilfosforilirane kolinesteraze (10). Oko 50% dimetilfosforilirane kolinesteraze eritrocita kunića spontano se reaktivira već za 90 minuta pri 37° C i pH 7.8 (11). Kod dietilfosforilirane kolinesteraze ljudskih eritrocita zbiva se 25-40% spontane reaktivacije pri 37° C i pH 7.45 za 24 sata (10, 12). Isti autori nisu, međutim, našli nikakvu spontanu reaktivaciju u slučaju diizopropilfosforilirane i izopropilmetilfosforilirane kolinesteraze.

Očito je da se pri hidrolizi fosforiliranog enzima ne oslobađa prvobitni inhibitor već neaktivna dialkilfosforna kiselina. I to je jedna od osnovnih razlika ireverzibilnih inhibitora u odnosu na reverzibilne,

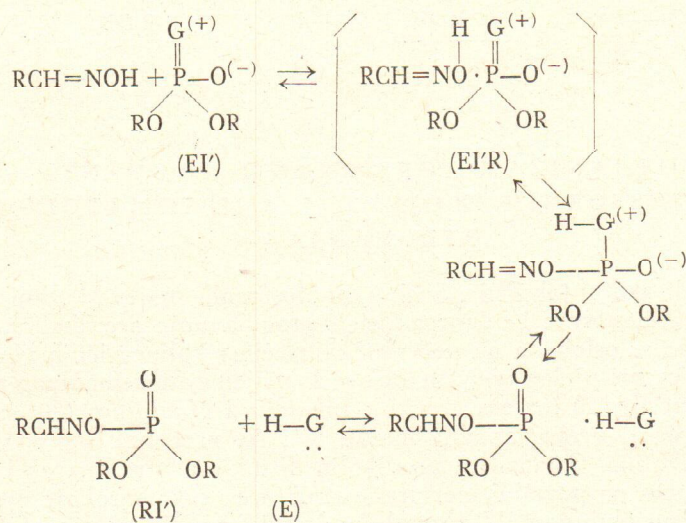
4. Reaktivacija nukleofilnim reagensima

Budući da je u fosforiliranoj kolinesterazi fosfor elektrofilan, voda, premda relativno slab nukleofilni reagens, može u određenim slučajevima reaktivirati inhibiranu kolinesterazu. Djelotvorni reaktivatori inhibirane kolinesteraze bit će, međutim, one supstancije kojih su nukleofilna svojstva znatno jače izražena.

Wilson (13) je utvrdio da kolin i hidroksilamin reaktiviraju dietilfosforiliranu kolinesterazu mnogo brže negoli sama voda, a dvije godine kasnije su Wilson i Meislich (14) postigli uspješnu reaktivaciju diizopropilfosforilirane kolinesteraze *in vitro* razrijeđenim otopinama nekih hidroksamskih kiselina. Dostojno se, međutim, pokazalo da su među istraživanim supstancijama najdjelotvorniji reaktivatori spojevi iz grupe oksima (14, 15).

Reaktivacija fosforilirane kolinesteraze uvjetovana je koncentracijom aniona reaktivatora i njegovom nukleofilnom aktivnošću, sposobnošću primanja protona kiselo grupe na esterskoj strani fosforilirane kolinesteraze, stupnjem komplementarnosti i jačinom vezanja između aniona reaktivatora i fosforilirane kolinesteraze. Najbolji do sada sintetizirani reaktivatori su piridinium-2-aldoksim metiljodid (PAM-2) (14, 16, 17, 18) i neki derivati bis-piridinium-4-aldoksima (19, 20, 21, 22, 23).

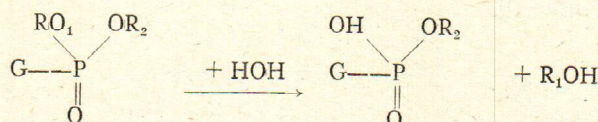
Reaktivacija fosforiliranog enzima odvija se u dvije faze. U prvoj fazi formira se kompleks između oksimskog iona i fosforiliranog enzima, a zatim slijedi otcjepljenje fosforiliranog oksima uz istovremeno vraćanje enzima u aktivni oblik (24, 25, 26). Slijed reakcija možemo predočiti ovim jednadžbama (9).



Brzina reaktivacije ne zavisi samo od vrste reaktivatora i od enzimskog preparata, nego – kao i u slučaju spontane reaktivacije vodom – i od supstituenata vezanih na fosfor. Tako je, na primjer, brzina reaktivacije različitih tipova fosforilirane kolinesteraze s kvarternim piridinijevim aldoksimima bila u ovom međusobnom odnosu: dietoksifosforilirana kolinesteraza > metilizopropoksifosforilirana kolinesteraza > diizopropoksifosforilirana kolinesteraza > dimetilaminoetoksifosforilirana kolinesteraza (27).

5. Starenje inhibirane kolinesteraze

Fosforilirani enzim prelazi s vremenom iz reverzibilnog stadija u ireverzibilni; u tom se stadiju inaktivirana kolinesteraza ne može više reaktivirati nikakvim reaktivatorima. Prelaz reverzibilnog u ireverzibilni oblik fosforilirane kolinesteraze odvija se *in vitro* i *in vivo* (28), i taj proces nazivamo »starenjem« inhibirane kolinesteraze. Berends i dr. (29) su pokazali da postoji uporednost između brzine »starenja« i brzine kojom se otejepljuje jedna izopropilna grupa od diizopropilne grupe fosforiliranog enzima. Na taj su način autori dokazali da prelaz dialkilfosforilirane kolinesteraze i izopropilmetilfosforilirane kolinesteraze u monoalkilfosforiliranu, odnosno metilfosforiliranu kolinesterazu uzrokuje stvaranje ireverzibilnog oblika inhibirane kolinesteraze. Proces dealkilacije zavisi od vrste radikala R_1 i R_2 u molekuli organofosfornog spoja: on je najbrži kod diizopropilfosforiliranog enzima, relativno brz kod dimetilfosforiliranog enzima, a relativno spor kod dietilfosforiliranog enzima.



II MEHANIZAM TOKSIČNOG DJELOVANJA ORGANOFOSFORNIH SPOJEVA I SIMPTOMATOLOGIJA OTROVANJA

Najvažniji akutni toksični učinci organofosfornih spojeva vezani su uz inhibiciju kolinesteraze i odgovarajuće nagomilavanje acetilkolina.

Acetilkolin se oslobađa na nervnim završecima kolinergičnih vlakana kao posljedica prispjelog impulsa, dok se za vrijeme funkcionalnog mirovanja oslobađaju tek malene količine. Emmelin i MacIntosh (30) su pokazali da gornji vratni ganglij mačke luči na preganglijski podražaj 25 $\mu\gamma$ acetilkolina. Oslobodeni acetilkolin difundira kroz sinapsu i veže se s receptorom na površini inervirane strukture i tako uzrokuje njezinu karakterističnu aktivnost. U normalnim je tkivima djelovanje acetilko-

lina vrlo kratko, jer kolinesteraza, koja se nalazi gotovo na istim mjestima gdje i kolinergični nervni završeci, katalizira njegovu hidrolizu.

Inhibicija kolinesteraze u okolini nervnih završetaka dovodi do akumulacije izlučenog acetilkolina (31), i on će u prvom redu na tom mjestu proizvesti svoje karakteristične učinke. Pored toga, acetilkolin difundira s mjesta oslobađanja u krv i limfne žile. Inhibicija kolinesteraze u krvi uvjetuje porast koncentracije acetilkolina u krvi, i na taj način acetilkolin može proizvesti značajne učinke na organima i tkivima koja se nalaze daleko od mjesta njegova oslobađanja (32).

Redoslijed pojavljivanja simptoma otrovanja organofosfornim spojevima zavisi od doze kao i od puta ulaska otrova u organizam čovjeka (33). Obično se prvi javljaju *muskarinski* učinci acetilkolina. To su pojave izazvane acetilkolinom na sinapsama postganglionarnih parasimpatičkih vlakana, a manifestiraju se pri lakšem otrovanju u vidu anoreksije, mučnine, znojenja i pritiska u epigastriju i ispod prsne kosti. Pri težem otrovanju razvijaju se jaki abdominalni grčevi, pojačana peristaltika, salivacija, suzenje i dispneja. Još teži simptomi otrovanja uključuju inkontinenciju fecesa i urina, prekomjernu bronhalnu sekreciju i edem pluća.

Nikotinski se učinci obično pojavljuju tek pošto su muskarinski učinci dosegli umjereni intenzitet. Oni su izazvani djelovanjem acetilkolina na neuromuskularnim sinapsama voljnih vlakna kao i na završecima preganglionarnih vlakana simpatičkog i parasimpatičkog sistema. Ti se učinci ispoljuju u mišićnim trzajima, fascikulacijama i grčevima. Istovremeno se razvija lako zamaranje i umjereni opća slabost, a pri jačem otrovanju dolazi do izrazite malaksalosti koja zahvaća i respiratorne mišiće.

Centralni učinci acetilkolina izazivaju napetost, tjeskobu, nemir, vrtoglavicu i emocionalnu labilnost. Dalji su simptomi nesanicu, otežana koncentracija, sporo prisjećivanje i zbunjenost. Pri umjerenom otrovanju mogu se naći promjene na elektroencefalogramu, i to iregularnost ritma, povećanje potencijala i izbijanje valova više ili manje sličnih valovima kod epilepsije. Subletalna, odnosno letalna doza organofosfornog spoja izaziva ataksiju, nerazgovijetno izgovaranje riječi, komu, arefleksiju, Cheyne-Stokesovo disanje i, najposlije, prestanak respiracije.

Do smrti najčešće dolazi zbog zastoja disanja. Pokusi na životinjama (34) su pokazali da ometanje respiracije mogu uzrokovati sva tri učinka acetilkolina: bronhokonstrikcija i povećana respiratorna sekrecija (muskarinski učinak), klijenut respiratornih mišića (nikotinski učinak) ili depresija respiratornog centra (centralni učinak). Jaka bronhokonstrikcija, koja je zapažena kod životinja, nije bila uočena kod čovjeka, a to se može protumačiti razlikom razvijenosti bronhijalne muskulature (35). Čini se da je klijenut respiratornog centra odlučujući faktor, od kojeg zavisi letalni završetak kod ljudi otrovanih organofosfornim spojevima.

III TERAPIJSKE MOGUĆNOSTI PRI OTROVANJU ORGANOFOSFORNIM SPOJEVIMA

Na osnovu toksikodinamičnih karakteristika otrovanja antikolinesterazama, tj. 1. da akumulirani acetilkolin, koji djeluje lokalno, potječe uglavnom od oslobađanja iz okolnih nervnih završetaka, 2. da tom djelovanju donekle može pridonijeti povećani nivo cirkulirajućeg acetilkolina i 3. da kolinacetilaza, acetilkolinesteraza kao i proteinski receptor sudjeluju u nastanku otrovanja, možemo s obzirom na korištenje supstancija koje antagoniziraju toksične učinke antikolinesteraza predvidjeti ove terapijske mogućnosti:

1. Razaranje inhibitora, 2. zaštitu kolinesteraze od inhibicije, 3. suzbijanje lokalne akumulacije acetilkolina na nervnim završecima, 4. sprečavanje pristupa acetilkolina na receptore i 5. reaktivaciju kolinesteraze.

Prve dvije mogućnosti su u biti profilaktičnog karaktera i djelovat će uspješno samo prije nego što otrov dospije do funkcionalnih mjesta djelovanja.

1. Razaranje inhibitora

Eksterna dekontaminacija

Koža je vrlo često glavni put ulaska organofosfornog spoja u organizam i ujedno je mjesto gdje možemo otrov najlakše razoriti kemijskim reakcijama.

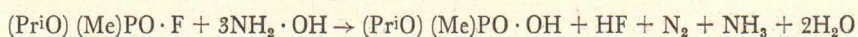
Jedan od prvih opisanih postupaka za dekontaminaciju kože, koji se još danas preporučuje i upotrebljava, je ponavljano pranje kože vodom i lužnatim sapunom (36, 37). *Fredrikson* (38) je vršio dekontaminaciju kože otrovanih zamoraca pomoću lužnatog sapuna (pH 10.5) i uspio spasiti 80% životinja, ako je uklonio otrov do 2 minute nakon perkutane aplikacije sarina.

Istraživana je hidroliza organofosfornih spojeva u prisustvu različitih supstancija i nađeno je da tu reakciju kataliziraju hidronijevi ioni i hidroksilni ion (39), nedisociirane metalne soli (39, 40) i kelati metala (41). Kloritni ion se pokazao kao najdjelotvorniji agens u hidroliziranju sarina (42) i kao takav može se upotrijebiti za dekontaminaciju kože. Za to može poslužiti i natrijev bikarbonat (43), ili razrijeđena lužina (44). Ne smiju se upotrijebiti jake lužine a ni organska otapala, a isto tako se ne smije iritirati koža grubim trljanjem.

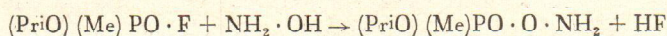
Naročitu pažnju privukli su spojevi s nukleofilnim svojstvima kao što su hidroksamske kiseline i oksimi zbog njihova reagiranja s organofosfornim spojevima. Za razliku od reaktivatorskog djelovanja nukleofilnih supstancija na inhibiranju kolinesterazi, reagiranje tih supstancija s organofosfornim spojevima nazivamo njihovim reaktivatorskim djelovanjem.

Hidroliza DFP, sarina (45) i TEPP (46) u vodi ubrzana je hidroksilaminom. Zavisnost brzine hidrolize od pH otopine ukazuje da je aktivni

spoj sâm hidroksilamin a ne hidroksilamonijev ion. Cjelokupna reakcija hidroksilamina sa sarinom može se prikazati ovako:



Brzina reakcije određena je, međutim, brzinom stvaranja fosforiliranog hidroksilamina, a to je jedan od stepena te reakcije:



Green i *Savilla* (47) su studirali hidrolizu sarina sa 2-okso-oksimuma u neutralnoj i slabo lužnatoj otopini i ustanovili da se reakcija odvija kao reakcija prvog reda u prisustvu suviška oksima. I u tom slučaju fosforilacija oksima je stepen koji određuje brzinu hidrolize. Ujedno su autori utvrdili da je anionska forma oksima aktivna.

Što se tiče reaktivnosti organofosfornih spojeva s oksimuma odnosno hidroksamskim kiselinama, ona se kod slijedećih spojeva povećava ovim redom: paraokson, DFP, TEPP, tabun i sarin.

Unatoč činjenici da brojni oksimi i hidroksamske kiseline reagiraju s organofosfornim spojevima brže nego hipokloriti ion, oni ga ipak ne mogu nadomjestiti za dekontaminaciju kože.

Razaranje inhibitora u organizmu

Terapijski učinak nukleofilnih supstancija zasniva se na reaktorskom i reaktivatorskom djelovanju tih spojeva i teško ih je razlučiti u istraživanjima koja se vrše na otrovanim životinjama. Dok se pri eksternoj dekontaminaciji radi samo o korištenju njihova reaktorskog djelovanja, pri testiranju reaktorskog djelovanja antidota u organizmu ne može se isključiti njihovo reaktivatorsko djelovanje na inhibiranu kolinesterazu ni u slučajevima kad se antidot aplicira životinji prije otrova, tj. »profilaktički«. Djelotvornost takvog načina aplikacije antidota naročito je istraživana u odnosu na zaštitu od potencijalnih bojnih otrova iz grupe antikolinesteraza. U ovom poglavlju navedeni su najznačajniji rezultati profilaktične aplikacije nukleofilnih supstancija, a o djelovanju oksima – apliciranih nakon otrova – bit će zasebno govora u poglavlju IV.

Pokusi izvedeni s hidroksilaminom bili su prvi koji su pokazali da se toksični učinci organofosfornih spojeva mogu suzbiti kemijskim spojem koji djeluje kao specifični antidot. Međutim, toksičnost hidroksilamina kao i činjenica da je njegov profilaktični efekt trajao manje od 30 minuta isključili su mogućnost njegove praktične upotrebe.

Dalji antagonisti, koji su pokazali profilaktičnu vrijednost pri otrovanju antikolinesterazama, pripadaju hidroksamskim kiselinama i spojevima iz grupe oksima (17, 49). *Dultz* i dr. (50) su našli da, pored hidroksamskih kiselina, brojni oksimi zaštićuju miševе od 2–3 LD₅₀ doze sarina. Kao najefikasniji profilaktički spoj pokazao se diacetilmonoksim (DAM), a njegov učinak je zavisio od vrste pokusne životinje. DAM se pokazao mnogo djelotvorniji u štakora negoli u majmuna, zamoraca, kunića ili miševa otrovanih sarinom (51).

Profilaktični učinak PAM-2 istražen je za niz organofosfornih otrova. Aplikiran miševima 20 minuta prije supkutane injekcije parationa, DFP, paraoksona ili sarina ispoljio je najbolji zaštitni učinak kod otrovanja paraoksonom, nešto slabiji kod DFP, dok je kod otrovanja sarinom i parationom taj učinak bio neznatan (52).

Bay i dr. (53) su pokazali na kunićima, mačkama i psima da je učinak TMB-4 u profilaksi otrovanja sarinom bio mnogo bolji od učinka PAM-2.

2. Biološki aktivne supstancije koje štite kolinesterazu kompetitivnom inhibicijom

Već su *Loewi* i *Navratil* (54) dokazali kompetitivnu prirodu reakcije fizostigmina i acetilkolina za kolinesterazu. *Koster* (55) je, čini se, bio prvi koji je upotrijebio reverzibilne inhibitore kolinesteraze da spriječi »ireverzibilnu« inaktivaciju enzima organofosfornim spojem *in vivo*. Ti pokusi pokazali su da fizostigmin injiciran prije DFP spriječi da se DFP veže za aktivni centar kolinesteraze. U vremenu potrebnom da se kompleks fizostigmin-kolinesteraza raspadne jedan će se dio nevezanog DFP hidrolizirati ili izlučiti iz organizma. Iste godine dokazao je *Koelle* (56) da fizostigmin i neostigmin štite kolinesterazu *in vitro* od inaktivacije sa DFP.

Koelle (56) je pokazao da prokain djeluje na sličan način kao reverzibilni inhibitori kolinesteraze. Prokain amid hidroklorid se pokazao djelotvornim dodatkom atropinu u profilaksi otrovanja sarinom kod kunića (57). Terapijsko djelovanje lokalnih anestetika može se, međutim, tumačiti njihovom sposobnošću da smanjuju oslobađanje acetilkolina na nervnim završcima (58) ili pak njihovim antagonističnim djelovanjem na nastale promjene permeabilnosti stanične membrane za K^+ ili Na^+ , zbog čega membrana postaje manje osjetljiva na depolarizirajuće supstancije kao što je acetilkolin (59).

Pored navedenih supstancija, i neki kolinski esteri pokazuju umjereni antagonistički učinak kod otrovanja organofosfornim spojevima. Tako su *McNamara* i dr. (60) objavili da dodavanje metilkolina profilaktičkoj smjesi atropin sulfata i magnezijeva sulfata – injicira li se intramuskularno 15–30 minuta prije intravenozne injekcije DFP – povećava zaštitno djelovanje spomenute smjese za 1.6 puta. Postoje dvije mogućnosti mehanizma zaštitnog djelovanja metilkolina: (1) da se veže na receptore na površini stanice i time blokira pristup acetilkolinu na ta mjesta, ili pak (2) da se kompetitivno veže na aktivni centar acetilkolinesteraze i time je štiti od inhibicije organofosfornim spojevima.

3. Supstancije koje sprečavaju sintezu odnosno oslobađanje acetilkolina

Budući da su toksični učinci otrovanja antikolinesterazama vezani uz akumulaciju acetilkolina, svaka supstancija koja smanjuje tu akumulaciju može predstavljati potencijalni antidot. U načelu, smanjenje akumulacije acetilkolina može se postići na dva načina: sprečavanjem sinteze acetilkolina u nervnom tkivu ili sprečavanjem njegova oslobađanja na nervnim završecima.

Poznato je da mnogi spojevi inhibiraju kolinacetilazni sistem koji je važan u sintezi acetilkolina. Aktivnim inhibitorima *in vitro* pokazali su se bakarni sulfat, flavonoidi, dibenamin i vitamin K₂, pa fizostigmin i neostigmin i hemikolinium-3 (48).

Među istraživanim flavonoidima najaktivniji inhibitor kolinacetilaze bio je morin. Međutim, testiran *in vivo*, kao antidot kod otrovanja TEPP na miševima (61), tek je neznatno povisio LD₅₀ organofosfornog spoja. U istim pokusima atropin, injiciran sâm, bio je bez učinka, a smjesa atropina i morina povisila je LD₅₀ TEPP za svega oko 30%.

Svaka supstancija koja blokira transmisiju podražaja u preterminalnim vlaknima blizu neuro-efektorne veze, vjerojatno će spriječiti oslobađanje acetilkolina ili drugog transmitera na nervnim završecima. Poznato je da to svojstvo imaju lokalni anestetici i toksin botulinusa. Lokalni anestetici djeluju na bilo koji tip živca, dok je, međutim, djelovanje botulinusa ograničeno samo na kolinergične živce (62). Dodavanjem 1 mg/kg dibukaina smjesi atropina i oksima povećala se profilaktična vrijednost smjese za 30%, a terapijska za 80% u kunića otrovanih organofosfornim spojem (48). Otrov botulinusa nije ispoljio antagonistički učinak (63, 48).

4. Supstancije koje blokiraju acetilkolinske receptore

Antagonizam između atropina i fizostigmina (64, 65) bio je poznat davno prije negoli je fizostigmin otkriven kao antikolinesterazni spoj (54). *McNamara* i dr. (60) su našli da je magnezijev sulfat bio gotovo bez učinka u zaštiti kunića otrovanih DFP, no kad su magnezijevom sulfatu dodali atropin (20 mg/kg), preživjelo je 2/3 otrovanih životinja. *Salerno* i *Coon* (66) su našli da atropin ukida učinke izazvane fizostigminom, DFP ili TEPP na krvnom pritisku, brzini rada srca, elektrokardiogramu i izoliranom ileumu, ali nije suzbio toksične učinke tih spojeva na izoliranom srcu.

Mehanizam djelovanja atropina zasniva se na njegovoj sposobnosti da priječi pristup acetilkolinu na one receptore gdje acetilkolin vrši muskarinska djelovanja (67).

Terapijsko djelovanje atropina u životinja otrovanih različitim organofosfornim spojevima istraživali su mnogi autori (tablica 1). U svim

Tablica 1.

Terapijsko djelovanje atropina u životinja otrovanih organofosfornim spojevima¹

Vrste	Otrov	Atropin mg/kg	Vrijeme aplikacije nakon otrova	Terapijski indeks ²
mačka	DFP	1	5 min.	2
	TEPP	1	10 min.	< 1
pas	šradan	2	20 min.	4
	sarin	1	nekoliko sek.	< 1
	tabun	1	nekoliko sek.	< 1
	TEPP	1	nekoliko sek.	3
zamorac	sarin	17.4	30 sek.	< 0.5
majmun	sarin	0.029	1 min.	2
miš	paration	5-50	nekoliko min.	0.3
		100	nekoliko min.	0.8
	paraokson	1	u isto vrijeme	0.2
		10	u isto vrijeme	0.8
	TEPP	10	u isto vrijeme	0.8
	sarin	17.4	30 sek.	0.5
štakor	EPN	90	nekoliko sek.	1
	sarin	17.4	30 sek.	0.5

¹ Prema Heath (72).² $\frac{LD_{50} \text{ liječenih životinja}}{LD_{50} \text{ neliječenih životinja}} - 1$

pokusima atropin je smanjio mortalitet otrovanih životinja, ali je rijetko kada povisio LD_{50} otrova za više od tri puta.

Atropin je danas najvažniji i najviše korišten farmakološki antidot u terapiji otrovanja ljudi otrovanih organofosfornim spojevima.

Primjenom manjih doza uspješno se uklanjaju muskarinski učinci dok veće doze suzbijaju dijelom i centralne nervne učinke izazvane antiko-linesterazama. Atropin sprečava bradikardiju i hipotenziju, zatim hiperaktivnost žlijezda i glatkih mišića respiratornog i gastrointestinalnog trakta, kao i konstrikciju pupila (68, 69, 70, 71, 33).

Oporavak, tj. poboljšanje kliničke slike otrovanja nakon primjene atropina može biti prolaznog karaktera, i zbog toga se doza atropina u mnogim slučajevima mora ponoviti. Količina atropina potrebna da ukloni učinke otrovanja zavisi od jačine simptoma, a isto tako će trajanje poboljšanja, izazvanog atropinom, zavisiti od težine kliničke slike otrovanja. Freeman i Epstein (73) ističu važnost ranc i izdašne primjene atropina za uspjeh u liječenju.

Svi se autori slažu u tome da je kod terapije otrovanih hipodoziranje atropina kudikamo opasnije od hiperdoziranja, koje se može uvijek prekinuti pojave li se znaci atropinizacije. Stoga su terapijske doze atropina relativno visoke i *Grob* (33) predlaže kod teških otrovanja doze od 2–4 mg atropina intravenozno ili intramuskularno. One se mogu ponavljati i sezati sve do 40 mg u toku 24 sata.

Doza atropina od 2 mg proizvodi slabe simptome atropinizacije kod osoba koje su apsorbirale malo ili ništa antikolinesternog spoja. Ponovi li se doza u razmaku od 1–2 sata, javljaju se umjereni simptomi atropinizacije koji uključuju tahikardiju, pupilarnu dilataciju te suhoću usta i kože. Nasuprot tome, kod osoba s umjerenim simptomima otrovanja nisu se simptomi atropinizacije razvili nakon doze atropina od 2 mg, a nisu se pojavili ni nakon ponovnog davanja te doze teže otrovanim osobama (74, 33).

Istraživanja mnogih autora (75, 76, 34) su pokazala da atropin, skopolamin i drugi terciarni antikolinergični spojevi ne antagoniziraju blok neuromuskularne transmisije proizveden antikolinestrazama. Međutim, neki kvarterni antikolinergični spojevi imaju tu sposobnost, tako da bi se mogli upotrijebiti kao dodaci atropinu u terapiji otrovanja antikolinestrazama. Tako je nađeno da N-benzilatropinium klorid povisuje broj preživjelih kunića, primijeni li se zajedno s atropinom prije injekcije sarina (77).

U terapiji otrovanja organofosfornim spojevima istražen je učinak D-tubokurarina, koji blokira djelovanje acetilkolina na završnim pločicama poprečno prugastih mišića. On se pokazao tek donekle djelotvornim kod otrovanja TEPP (78).

Magnezijev sulfat ispoljio je slab terapijski učinak u kunića otrovanih DFP, dok u mačaka nije bio djelotvoran (79, 60). Nije razjašnjeno da li magnezijevi ioni blokiraju receptore slično kao i kurare ili ubrzavaju reaktivaciju inhibirane kolinesteraze (12).

Heksametonij, injiciran miševima u isto vrijeme kad i TEPP, povisio je LD₅₀ posljednjeg tri puta (78). Terapijski učinak heksametonija zasniva se na tome što antagonizira djelovanje acetilkolina u ganglijima i blokira receptore poprečno prugaste muskulature.

Primijenjen u velikim dozama, buskopan (skopolamin-butilbromid) je imao gotovo isto terapijsko djelovanje kao i atropin u štakora otrovanih parationom, metilparationom i sistoksom (80).

5. Supstancije koje reaktiviraju fosforiliranu kolinesterazu

Tako dugo dok se organofosforne spojeve smatralo ireverzibilnim inhibitorima kolinesteraze, činilo se da ne postoji mogućnost specifične terapije otrovanja tim spojevima. *Wilson* (13) i *Hobbiger* (12) su, međutim, pokazali da se kolinesteraza inhibirana organofosfornim spojem može postepeno reaktivirati vodom. Mnogo brža reaktivacija postignuta

je hidroksilaminom i kolinom (13). Nakon toga, traganje za što boljim reaktivatorima inhibirane kolinesteraze nastavilo se velikim intenzitetom (7) i među brojnim sintetiziranim nukleofilnim supstancijama otkriveni su neki oksimi monokvarternog ili biskvarternog tipa, koji se danas smatraju za najdjelotvornije reaktivatore inhibirane kolinesteraze *in vitro*, i zajedno s atropinom uspješno se koriste u terapiji otrovanja organofosfornim spojevima.

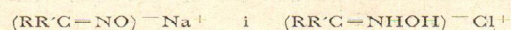
Biološka svojstva i terapijska vrijednost najvažnijih antidota iz grupe oksima potanje su obrađena u narednom poglavlju.

IV BIOLOŠKA SVOJSTVA OKSIMA I NJIHOVA TERAPIJSKA VRIJEDNOST PRI OTROVANJU ORGANOFOSFORNIM SPOJEVIMA

1. Neke fizikalno-kemijske karakteristike oksima

Oksimi su spojevi koje karakterizira grupa —C=NOH . Derivati su aldehida ili ketona i prema tome se dijele u dvije skupine: aldoksime i ketoksime. Dobivaju se reakcijom odgovarajućih aldehida ili ketona s hidroksilaminom.

Oksimi su kristalinične supstancije koje u vodenoj otopini imaju svojstva slabih baza i kiselina te stvaraju ove soli:



Piridinium-2-aldoksim metiljodid (PAM-2) je žuta kristalinična tvar, topljiva u vodi u koncentracijama do 50%, a praktički netopljiva u etilnom alkoholu. Metansulfonatna sol piridinium-2-aldoksima (P_2S) topljiva je u vodi u koncentracijama do 40% (81), dok je piridinium-2-aldoksim metilklorid (PAM-2 klorid) izrazito topljiv, tako da se 1 g supstancije otapa u manje od 1 ml vode.

Kemijske strukture najefikasnijih oksima prikazane su na tablici 2.

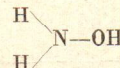
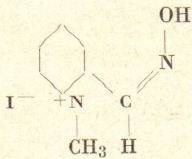
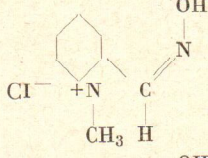
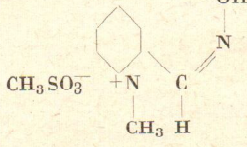
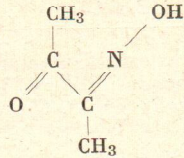
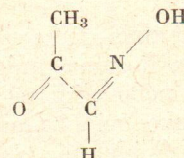
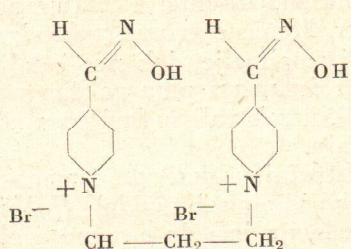
2. Toksičnost oksima

Među važnim svojstvima koja su bila istraživana uporedo s testiranjem novih oksima kao potencijalnih antidota pri otrovanju organofosfornim spojevima, bila je njihova otrovnost za sisavce kao i poznavanje mehanizma njihova toksičnog djelovanja. U tablici 3. je prikazana intravenozna, intraperitonealna i peroralna otrovnost najvažnijih oksima za miševе.

PAM-2 i TMB-4 kloridi nešto su manje otrovni od odgovarajućih jodida i bromida, upoređi li se njihova toksičnost na molarnoj bazi

Tablica 2.

Kemijska imena, skraćena imena i strukturne formule nekih važnijih oksima koji su istraživani kao antidoti pri otrovanju organofosfornim spojevima

Kemijsko ime	Skraćeni naziv	Strukturna formula
Hidroksil-amin		
Piridin-2-aldoksim metiljodid	PAM-2 ili PAM-2 jodid pralidoksim	
Piridin-2-aldoksim metilklorid	PAM-2 klorid Protopamopam PAM-Cl	
Piridin-2-aldoksim metilmetansulfonat	P2S	
Diacetilmonoksim	DAM	
Monoizonitrozoacetone	MINA	
1,1-trimetilen bis (4-formil-piridinium bromid) dioksim	TMB-4 ili TMB-4 dibromid	

Tablica 3.
Akutna toksičnost nekih oksima za miševе, nakon različitih puteva aplikacije
 LD_{50} mol/kg

Oksimi	Aplikacija		
	Intravenozna	Intraperitonealna	Peroralna
DAM	—	8.91 ^{*1}	—
	—	0.5 ²	—
	—	0.84 ³	—
MINA	—	1.72 ¹	—
	—	0.57 ⁴	—
PAM-2	0.65 ⁵	0.52 ⁶	15.27
	0.55 ³	0.85 ³	5.68 ⁹
	—	0.72 ¹	—
	—	0.88 ⁴	—
	—	0.60 ¹⁰	—
PAM-Cl	—	1.00 ¹¹	—
	0.63 ⁸	1.29 ⁷	22.4 ⁷
P ₂ S	0.53 ⁴	0.8 ⁴	15.9 ¹²
	—	10.5 ^{4**}	—
TMB-4 Br ₂	0.2 ⁵	0.29 ¹¹	—
	0.119 ⁶	—	—
TMB-4 Cl ₂	0.16 ⁸	—	—

* Indeks označava autore: 1. *Dultz* i dr. (50), 2. *Kewitz* i *Wilson* (83), 3. *Loomis* (84), 4. *Davies* i *Willey* (81), 5. *Fleisher* i dr. (27), 6. *Kewitz* i dr. (18), 7. *Lehman* i *Nicholls* (85), 8. *O'Leary* i dr. (82), 9. *Edey* i *Schatzberg-Porath* (86), 10. *Namba* (87), 11. *Hobbiger* i *Sadler* (88), 12. *Coleman* i dr. (89).

** Štakor.

(82). Budući da se oksimi u terapiji otrovanja primjenjuju u relativno velikim dozama, anioni jodida i bromida mogu već sami po sebi proizvesti nepoželjni učinak.

Gotovo svi oksimi proizvode na životinjama slične simptome otrovanja. Subletalne doze oksima izazivaju smanjenu aktivnost životinja i otežano disanje, a letalne doze prouzrokuju prostraciju, mišićni tremor, klonične grčeve, gubitak refleksa, cijanozu, dispnoju i, najzad, zastoj respiracije, dok srce i dalje radi. PAM-2 klorid i P₂S u ponavljanim dozama 2 puta na dan po 25 mg/kg intravenozno, kroz 6 tjedana (90), uzrokovali su kod pasa ataksiju, povraćanje, kolaps, tremor i salivaciju.

Istražujući derivate 4-monoksima i 4,4 dioksima od N,N'-polimetilen bis(piridinium bromida), *Hobbiger* i *Sadler* (88) su pokazali da postoji korelacija između otrovnosti oksima za miševе i sposobnosti blokiranja neuromuskularne transmisije na izoliranoj dijafragmi štakora,

Sličnost spomenutih simptoma otrovanja antikolinesterazama, kao i rezultati istraživanja djelovanja oksima *in vitro* (91) doveli su do ključka da se mehanizam toksičnog djelovanja većine oksima zasniva na inhibiciji kolinesteraze. MINA i diizonitroacetone (DINA) su izuzeci, budući da metabolizmom tih spojeva u organizmu nastaje cijanid, pa je uginanje otrovanih životinja posljedica otrovanja cijanidom (92).

Postmortalni nalaz u miševa, kojima je prethodno injiciran PAM-2 u letalnim dozama, sastojao se iz edema parenhimnih organa (mozga, pluća, bubrega i slezene) i opće vazodilatacije (87). Letalne doze P₂S proizvele su venoznu hiperemiju bubrega kao i hiperemiju i kolaps pluća s umjerenom hemoragijom (81).

3. Distribucija i ekskrecija oksima

Budući da terapijski učinak antidota zavisi, pored ostalih bioloških osobina, i od njegove postojanosti i distribucije u organizmu, kao i od njegova metabolizma i ekskrecije, mnogi su autori istraživali oksime i u tom pravcu.

Mjerenjem koncentracija oksima u krvi kunića, pasa i ljudi, pokazalo se da se P₂S, PAM-2 klorid i TMB-4 brzo resorbiraju nakon intramuskularne injekcije (93, 94, 95, 96). Resorpcija oksima iz gastrointestinalnog trakta je, međutim, mnogo sporija. *Sundwall* i *Elwin* (94) su ustanovili da se P₂S resorbira iz duodenuma i proksimalnog dijela jejunuma, a ne iz želuca.

Poslije intravenozne injekcije, koncentracije P₂S i PAM-2 klorida u krvi kunića, kao i koncentracija P₂S u plazmi čovjeka, brzo se smanjuju. Koncentracija TMB-4 u krvi kunića smanjuje se nešto sporije i zadržava se na oko dva puta većim vrijednostima od ostala dva oksima (93, 96).

S obzirom na relativno veliku molekulu i ionsku strukturu piridinijevih oksima, možemo pretpostaviti da ti spojevi teško prolaze kroz staničnu membranu i hemo-encefalnu barijeru. Istraživanja mnogih autora potvrđuju da piridinijevi oksimi u prvom redu kumuliraju u jetni i bubregu i da ne penetriraju lako u centralni nervni sistem (97, 98, 99, 100). Pokazalo se da PAM-2 ne prolazi ni kroz staničnu membranu eritrocita (98).

Rezultati istraživanja koja su vršili *Firemark* i dr. (101) sa C¹⁴ – označenim PAM-2 ukazuju, međutim, da PAM-2 ipak može prodrijeti u centralni nervni sistem čakora u farmakološki značajnim količinama. Nakon aplikacije toksičnih doza diptereksa to je prolaženje bilo još veće. Potvrda tim nalazima su i ranija istraživanja, u kojima se našlo da PAM-2 uzrokuje brzu stimulaciju respiracije u pasa otrovanih sarinom (102). Što više, nakon aplikacije PAM-2 zapažena je i reaktivacija inhibirane kolinesteraze pojedinih regija mozga kunića otrovanih paraoksonom (103).

Bubreg je, čini se, glavni organ koji je odgovoran za eliminaciju oksima iz krvi. Najveći dio injiciranog oksima izlučuje se preko bubrega nerazgrađen – u aktivnom obliku (94, 98, 100, 104).

4. Reaktivacija fosforilirane kolinesteraze *in vitro* i *in vivo*

Najefikasniji reaktivator iz grupe monokvarternih piridinijevih aldoksima je PAM-2. Izrazitu reaktivatorsku moć ovog oksima prvi su objavili *Davies* i *Green* (105) pa *Wilson* i *Ginsburg* (16). PAM-2 u koncentraciji od 10^{-5} M reaktivira dietilfosforiliranu kolinesterazu u roku od jedne minute (16, 17). Reaktivacija se u prisustvu suviška oksima odvija kao reakcija prvog reda (pseudo-unimolekularna reakcija). Reaktivatorska moć oksima zavisi i od tipa inhibiranog enzima. Diizopropilfosforilirani enzim reaktivirao se mnogo sporije od dietilfosforilirane kolinesteraze (28).

PAM-4 i PAM-3 ispoljili su svega 6% odnosno 0.03% reaktivatorske moći u odnosu na PAM-2 kad im se djelovanje uporedilo na dietilfosforiliranoj kolinesterazi ljudskih eritrocita (91). Na osnovu tih zapažanja kao i pokusa što su ih ranije opisali *Green* i *Smith* (26), bolji reaktivatorski učinak PAM-2 može se, uglavnom, tumačiti razlikama vezanja oksima na fosforiliranu kolinesterazu. Kao dokaz da se kvarterna amonijeva grupa PAM-2 veže na anionsku stranu fosforilirane kolinesteraze uzima se činjenica da neki kationi (Na^+ , K^+ i NH_4^+), zatim kolin ili visoke koncentracije acetilkolina koče reaktivaciju dietilfosforilirane ili izopropilmetilfosforilirane kolinesteraze tim oksimom (106, 23, 25).

Naidjelotvorniji oksim iz grupe derivata bis-piridinium-4-aldoksima je TMB-4. Njegova reaktivatorska moć *in vitro* nadmašuje reaktivatorsku moć PAM-2 nekoliko puta (91).

U pokusima *in vivo* ubrzo se pokazalo da većina oksima injiciranih u dozama koje povisuju LD_{50} vrijednost nekog organofosfornog spoja reaktiviraju fosforiliranu kolinesterazu krvi, diafragme i drugih organa, izuzevši kolinesterazu mozga. Tako su *Kewitz* (107) i *Hobbiger* (108) našli kod miševa otrovanih supkutano dietilfosfatnim esterima izraziti reaktivatorski učinak PAM-2 na kolinesterazi diafragme odnosno krvi nakon intraperitonealne aplikacije oksima. Slični učinci opisani su za PAM-2, DAM i MINA na štakorima otrovanim sarinom (109) kao i za neke derivate 4-monoksima i 4-dioksima N,N'-polimetilen-bis (piridinium bromida) na miševima otrovanim TEPP (88).

Znatno povišenje aktivnosti kolinesteraze eritrocita našli su *Namba* i *Hiraki* (110) kod kunića otrovanih parationom a tretiranih intravenozno sa 0.10 do 0.68 mM PAM-2/kg. U nekim slučajevima reaktivacija je bila prolazna, vjerojatno zbog toga što se prijetvor parationa u aktivni inhibitor paraokson nastavio i pošto je koncentracija PAM-2 pala ispod efektivne razine. Do istih zaključaka došli su i *Svetličić* i *Vande-*

kar (11) na osnovu pokusa na psima i konjima otrovanim parationom i liječenim sa PAM-2.

Do brzog vraćanja aktivnosti kolinesteraze eritrocita kunića došlo je kod životinja otrovanih paraoksonom ili parationom nakon intraperitonealne aplikacije 0.29 mM PAM-2/kg (112).

U skladu s rezultatima testiranja reaktivatorske moći oksima *in vitro*, PAM-2 i TMB-4 su se pokazali i u pokusima *in vivo* kao najdjelotvorniji reaktivatori inhibirane kolinesteraze. Postoji, međutim, jedna bitna razlika u reaktivatorskoj moći tih oksima *in vitro* i *in vivo*, i to s obzirom na reaktivaciju kolinesteraze mozga.

Suprotno od sposobnosti PAM-2 i TMB-4 da reaktiviraju kolinesterazu u krvi i mišićima otrovanih životinja, nije zabilježen reaktivatorski učinak tih oksima na inhibiranoj kolinesterazi mozga (107, 108, 109, 113, 27, 88). Izuzetak je prije spomenuti rad *Rosenberga* (103) koji je našao reaktivaciju inhibirane kolinesteraze u pojedinim regijama mozga kunića otrovanih paraoksonom. Slabi ili nikakvi reaktivatorski učinak na inhibiranu kolinesterazu mozga možemo tumačiti fizikalno-kemijskim svojstvima tih spojeva, koji uvjetuju slabo prolaženje tih oksima kroz hemo-encefalnu barijeru. U prilog tom tumačenju govore pokusi koje su vršili *Rutland* (109) i *Cohen* i *Wiersinga* (114) s MINA i DAM. Autori su našli da ta dva oksima koji su, za razliku od PAM-2 i TMB-4, topljivi u mastima reaktiviraju kolinesterazu mozga štakora otrovanih sarinom.

5. Učinci oksima na pojedine simptome otrovanja organofosfornim spojevima

Istraživanja terapijskih učinaka oksima kod otrovanja organofosfornim spojevima ubrzo su pokazala da pored reaktivatorskog djelovanja na inhibiranu kolinesterazu oksimi imaju i druga djelovanja, koja se većinom mogu svesti na djelovanje slično atropinu, a nešto na učinke slične djelovanju kurara.

Poznato je da je jedan od prvih sistematskih učinaka koji se javljaju kod otrovanja antikolinesterazama, bradikardija na koju se uskoro nadovezuju i druge promjene na elektrokardiogramu (115). To je, vjerovatno, uzrokovano akumulacijom acetilkolina u srčanim parasimpatičkim ganglijima (115, 116). Primjenom PAM-2 (117) i TMB-4 (118) bradikardija naglo nestaje, a pokazalo se da PAM-2, poput atropina, vraća promjene na elektrokardiogramu na normalu. Budući da se normaliziranje srčanog ritma zbiva već 5–10 minuta nakon intravenoznog injiciranja oksima, vrlo je vjerovatno taj učinak oksima vezan – poput onog što ga proizvodi atropin – na njegovo »antiacetilkolinsko djelovanje« a ne na reaktivaciju fosforilirane kolinesteraze.

Paraoksonom izazvan podražaj izoliranog crijeva kunića može se suzbiti sa 10^{-8} M atropina ili 6×10^{-5} M PAM-2 (119). Pošto je crijevo

bilo isprano, podražaj se ponovo vraćao, ako kontakt oksima s crijevima nije bio dovoljno dug. Svi ti nalazi govore u prilog tome da oksimi djeluju slično kao atropin, a dalja potvrda toj pretpostavci su nalazi *Erdmanna* i *Heyea* (119) i *Hobbigera* i *Sadlera* (88) da PAM-2 i TMB-4 reduciraju osjetljivost crijeva kunića i zamoraca na acetilkolin.

S druge strane, neki su autori pokazali da se podražajno djelovanje organofosfornih spojeva na crijevo može naglo suzbiti atropinom, dok su PAM-2 i TMB-4 bili tek umjereno djelotvorni (95, 118).

Ostale muskarinske simptome otrovanja, kao što su bronhokonstrikcija i stimulacija kolinergičkih inerviranih žlijezda, mogu se suzbiti atropinom, ali je mehanizam djelovanja oksima na njih slabo istražen (116).

Pokusi na izoliranom živcu dijafragme su pokazali da MINA, DINAM, PAM-2 i TMB-4 izazivaju oporavak neuromuskularnog bloka koji je bio uzrokovan raznim organofosfornim spojevima (120, 121, 27, 95). Djelovanje oksima u suzbijanju neuromuskularnog bloka zasniva se na reaktivaciji fosforilirane kolinesteraze, no čini se da se u slučaju TMB-4 brzi oporavak funkcije djelomično zasniva i na djelovanju sličnom djelovanju kurara.

Lehman i dr. (85) ustanovili su da PAM-2 sprečava učinke fosfolin jodida na brzinu rada srca, krvni pritisak, respiraciju i neuromuskularnu transmisiju u mačaka. Muskarinski i nikotinski učinci izazvani parationom kod pasa i konja bili su otklonjeni aplikacijom PAM-2 0.2 mM/kg i. p., odnosno 0.08 mM/kg i. v. (111). Neuromuskularni blok mačaka otrovanih sarinom pošlo je za rukom suzbiti sa P2S odnosno TMB-4 ili pak mješavinom dvaju oksima (82). Djelotvornost različitih oksima u suzbijanju neuromuskularnog bloka mačaka otrovanih sarinom išla je ovim redom: PAM-2 > PAM-4 > MINA ≫ piridin-2-aldoksim, PAM-3, DAM (122).

Dok atropin djelotvorno suzbija centralno izazvano zatajenje disanja čak i nakon velikih doza paraoksiona, TEPP, sarina i DFP (116), PAM-2 i P2S su u tome bili bez učinka (123, 124). To se općenito pripisuje ograničenoj sposobnosti penetracije kvarternih spojeva u centralni nervni sistem. Suprotno tome, opisani su i centralni učinci PAM-2, kao što je sinhronizacija elektroencefalograma (125), njegova antikonvulzivna djelatnost kod ljudi otrovanih parationom (126, 127) i povratak svijesti kod ljudi otrovanih parationom (110, 126, 127, 128).

6. Terapijski učinci oksima i atropina pri otrovanju organofosfornim spojevima

Uporedo s pokusima *in vitro*, u kojima su se oksimi pokazali dobrim reaktivatorima kolinesterazc inhibirane organofosfornim spojevima, pristupilo se testiranju njihove terapijske vrijednosti u životinja otrovanih tim spojevima. Ta su istraživanja pokazala da učinak oksima *in vivo*

zavisi ne samo od organofosfornog spoja i vrste otrovanih životinja, već i od načina aplikacije otrova odnosno antidota a napose od trajanja vremenskog intervala između aplikacije otrova i antidota.

Askew (92) je prva upozorila da ne postoji uvijek korelacija između reaktivatorske moći koju neki oksim ispoljuje *in vitro* i njegova terapijskog učinka *in vivo*.

Isto tako se ubrzo pokazalo da simultana aplikacija oksima s atropinom proizvodi mnogo bolji terapijski učinak od očekivanog aditivnog učinka. Uporedimo li npr. terapijski učinak PAM-2 s djelovanjem što ga proizvodi sam atropin i kombinacija PAM-2 s atropinom, vidimo da kod kunića otrovanih sarinom (129) učinak kombinirane terapije znatno nadvisuje učinak pojedinačno apliciranih antidota: PAM-2 povisio je LD₅₀ sarina 1.5, atropin 3.2, a kombinacija PAM-2 s atropinom 21 puta. Sinergističko djelovanje atropina u terapiji oksimima kod otrovanja organofosfornim spojevima može se protumačiti mehanizmima terapijskog djelovanja obaju antidota koji se među sobom dopunjuju, a vrlo vjerojatno i time što atropin dovoljno produljuje život otrovane životinje i na taj način omogućuje oksimu da ispolji svoje reaktivatorsko djelovanje.

Većina autora prikazala je uspješan terapijski učinak PAM-2 i TMB-4 kod otrovanja inhibitorima koji formiraju dietilfosforiliranu kolinesterazu (130, 27, 52, 82, 88, 99, 106), zatim kod otrovanja sarinom (131, 20, 27, 84), tabunom (27, 122) i DFP (18, 20, 88).

Koliko terapijski učinak oksima zavisi od organofosfornog spoja pokazali su *Fleischer* i dr. (27) upoređujući učinak PAM-2 i TMB-4 na štakorima otrovanim sa TEPP, sarinom, DFP i tabunom (tablica 4).

Tablica 4.

Terapijski učinak PAM-2 i TMB-4 zajedno s atropinom na štakorima otrovanim različitim tipovima inhibitora

Inhibitor	Terapijski učinak*	
	PAM-2	TMB-4
TEPP	23	160
Sarin	2.3	12
DFP	16	23
Tabun	1.5	10

* LD₅₀ liječenih životinja

LD₅₀ neliječenih životinja

Hobbiger (108) je pokazao da se terapijski učinak oksima razlikuje i kod otrovanja među sobom srodnih, npr. dietilfosfatnih estera, premda pri inhibiciji kolinesteraze stvaraju jednaki tip fosforiliranog enzima.

Među spojevima koji su sami po sebi slabi inhibitori kolinesteraze, ali se u tijelu pretvaraju u snažne inhibitore, detaljnije su istraženi učinci oksima u životinja otrovanih parationom. Ti su radovi ukazali na potrebu ponavljane aplikacije oksima, zbog relativno spore konverzije parationa u paraokson u otrovanoj životinji (132, 133, 52, 111).

Terapijski učinak oksima pri otrovanju s TEPP i sarinom (122, 131), odnosno parationom (111) zavisio je i od vrste pokusne životinje. Različitu djelotvornost P2S s obzirom na životinjsku vrstu, ilustriraju rezultati koje su dobili *Davies* i dr. (131), a prikazani su na tablici 5.

Tablica 5.

Terapijski učinak P2S i atropina (i. m.) kod različitih životinja otrovanih sarinom ili TEPP (s. c.) (131)

Životinje	Terapijski učinak* Antidoti primijenjeni 1 minutu poslije otrovanja	
	Sarin	TEPP
miš	4.0	20
štakor	1.6	5.8
zamorac	38	20
kunić	40	21

* LD₅₀ liječenih životinja

LD₅₀ neličenih životinja

Uspješna terapija oksimima zavisit će i od brze primjene antidota, kao i od puta aplikacije, od kojeg zavisi pristizanje antidota na mjesto njegova djelovanja. Intramuskularna injekcija P2S i atropina 1 minutu nakon supkutano injiciranog TEPP ili sarina ispoljuje određeni terapijski učinak (tablica 5). To je djelovanje nakon intramuskularne injekcije kratkotrajno pa je, vjerojatno, i to jedan od razloga slabog terapijskog učinka oksima kod perkutanog otrovanja sarinom (134). Nakon peroralne primjene oksima, njegovo antidotno djelovanje je znatno produljeno, ali je brzina resorpcije tako spora da ta primjena ne dolazi u obzir u terapiji otrovanja (93) već samo u profilaksi (85, 89).

Neki su autori istraživali mogućnost kombinacije dvaju oksima u terapiji otrovanja organofosforinim spojevima. *O'Leary* i dr. (82) su našli da kombinacija PAM-2 i TMB-4 zajedno s atropinom proizvodi mnogo veći terapijski učinak kod otrovanja sarinom i tabunom, nego kad su uz atropin primijenili samo jedan oksim. U suprotnosti s ovim rezultatima, *Milošević* i dr. (113) su našli da kombinirana terapija PAM-2 i TMB-4 kod otrovanja fosfamidonom ispoljuje manji terapijski učinak od učinka postignutog aplikacijom bilo kojeg oksima zasebice.

7. Terapijsko djelovanje PAM-2 kod ljudi otrovanih organofosfornim spojevima

Od istraživanih oksima do sada su najčešće primijenjeni PAM-2 i PAM-2 klorid u terapiji otrovanih ljudi.

Mnogi su autori (110, 126, 127, 135, 136) dokazali veliku vrijednost PAM-2 kao antidota kod otrovanja parationom. U teškim slučajevima otrovanja, gdje ni velikim dozama atropina nije uspjelo spriječiti otežano disanje, grčeve i gubitak svijesti, oksim je neposredno nakon aplikacije proizveo znatno poboljšanje kliničke slike otrovanja.

U svim slučajevima terapije otrovanih ljudi oksimi su bili aplicirani intravenozno. Već u dozama od 5–10 mg/kg PAM-2 je ispoljio terapijski učinak (128, 137, 138), ali većina autora preporučuje veće doze (20–30 mg/kg) ili pak polaganu infuziju oksima u dozi od 100 mg/kg (110, 126). Budući da se oksim brzo izlučuje iz organizma, često je potrebno ponavljati doze antidota (138).

Quinby (139) je opisao terapijske učinke PAM-2 i PAM-2 klorida kod 24 slučaja otrovanja različitim organofosfornim spojevima. Oksim apliciran zajedno s atropinom proizveo je najbolji terapijski učinak kod ljudi otrovanih parationom, dok je protiv toksičnih učinaka fosdrina bio nešto slabiji. Kod ljudi otrovanih s TEPP ili malationom proizveo je tek neznatno poboljšanje. Autor je naročitu pažnju posvetio sporednim efektima koje proizvodi oksim, i smatra da nisu toliko značajni da bi se zbog toga ograničila njegova primjena u terapiji teških otrovanja organofosfornim spojevima.

Nedavno su Erdmann i von Clarmann (140) opisali jedan novi reaktivator: bis(4-hidroksiiminometil-piridinium-(1)-metil)-eter diklorid (toksogonin), koji se pokazao u svom terapijskom djelovanju boljim od PAM-2. Apliciran u dozi od 250 mg intravenozno nije izazvao nikakvih popratnih pojava u liječenih bolesnika. Podaci o njegovoj kompatibilnosti, načinu djelovanja, apsorpciji i izlučivanju, dobiveni na akutnim i subakutnim pokusima na životinjama (141), ukazuju da je toksogonin sličan PAM-2 i TMB-4. Međutim, novoopisani spoj daleko nadmašuje ove antidote u brzini i mjeri reaktivacije inhibirane kolinesteraze. Isti autori ističu da, za razliku od ostalih kvarternih oksima, pri velikim dozama toksogonin prolazi kroz hemoencefalnu barijeru. Taj se spoj svestrano istražuje i pod drugim nazivima: LüH 6, BH 6 Ly ili BH6 (142, 143, 144).

Premda se mnogi reaktivatori inhibirane kolinesteraze danas uspješno primjenjuju u praksi, rad na sintezi i testiranju novih antidota iz grupe oksima i dalje se nastavlja s ciljem da se pronađu spojevi koji će – s obzirom na njihova fizikalno-kemijska i biološka svojstva – zadovoljiti u punoj mjeri kao lijekovi u terapiji otrovanja organofosfornim spojevima.

Literatura

1. Nachmansohn, D., Wilson, I. B.: The Enzymic Hydrolysis and Synthesis of Acetylcholine, *Advanc. Enzymol.*, 12 (1951) 259.
2. Wilson, I. B., Bergmann, F.: Cholinesterase. VII. The Active Surface of Acetylcholine Esterase Derived from Effects of pH on Inhibitors, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 479.
3. Wilson, I. B., Quan, C.: Acetylcholinesterase Studies on Molecular Complementariness, *Arch. Biochem.*, 73 (1958) 131.
4. Bergmann, F., Wilson, I. B., Nachmansohn, D.: The Inhibitory Effect of Stilbamidine, Curare and Related Compounds and its Relationship to the Active Groups of Acetylcholine Esterase, *Biochim. biophys. Acta*, 6 (1950) 217.
5. Bergmann, F., Wilson, I. B., Nachmansohn, D.: Acetylcholinesterase. IX. Structural Features Determining the Inhibition by Amino Acids and Related Compounds, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 693.
6. Wilson, I. B., Bergmann, F., Nachmansohn, D.: Acetylcholinesterase. X. Mechanism of the Catalysis of Acylation Reactions, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 781.
7. Hobbiger, F.: Reactivation of Phosphorylated Acetylcholinesterase, pagl. 21. u: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, sv. 15, Springer-Verlag, Berlin, 1963.
8. Aldridge, W. N.: The Inhibition of Erythrocyte Cholinesterase by Tri-esters of Phosphoric Acid. 3. The Nature of the Inhibitory Process, *Biochem. J.*, 54 (1953) 442.
9. Wilson, I. B.: Acetylcholinesterase, u: *The Enzymes*, Vol. 4, Part A, str. 501, Boyer, Lardy i Myrback, New York, 1960.
10. Burgen, A. S. V., Hobbiger, F.: The Inhibition of Cholinesterase by Alkylphosphates and Alkylphenylphosphates, *Brit. J. Pharmacol.*, 6 (1951) 593.
11. Aldridge, W. N., Davison, A. N.: The Mechanism of Inhibition of Cholinesterases by Organophosphorus Compounds, *Biochem. J.*, 55 (1953) 763.
12. Hobbiger, F.: Inhibition of Cholinesterase by Irreversible Inhibitors *in vitro* and *in vivo*, *Brit. J. Pharmacol.*, 6 (1951) 21.
13. Wilson, I. B.: Acetylcholinesterase. XL. Reversibility of Tetracthyl Pyrophosphate Inhibition, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 111.
14. Wilson, I. B., Meislich, E. K.: Reactivation of Acetylcholinesterase Inhibited by Alkyl Phosphates, *J. Amer. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4628.
15. Davies, D. R., Green, A. L.: The Kinetics of Reactivation, by Oximes, of Cholinesterase Inhibited by Organophosphorus Compounds, *Biochem. J.*, 63 (1956) 529.
16. Wilson, I. B., Ginsburg, S.: A Powerful Reactivator of Alkyl Phosphate - Inhibited Acetylcholinesterase, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 168.
17. Childs, A. F., Davies, D. R., Green, A. L., Rutland, I. P.: The Reactivation by Oximes and Hydroxamic Acids of Cholinesterase Inhibited by Organophosphorus Compounds, *Brit. J. Pharmacol.*, 10 (1955) 462.
18. Kewitz, H., Wilson, I. B., Nachmansohn, D.: A Specific Antidote Against Lethal Alkylphosphate Intoxication. II. Antidotal Properties, *Arch. Biochem.*, 64 (1956) 456.
19. Poziomek, E. J., Hackely, B. E. jun., Steinberg, G. M.: Pyridinium Aldoximes, *J. Org. Chem.*, 23 (1958) 714.
20. Hobbiger, F., Sadler, P. W.: Protection by Oximes of Bis-pyridium ions Against Lethal Diisopropyl Phosphonofluoridate Poisoning, *Nature*, 182 (1958) 1672.
21. Hobbiger, F., O'Sullivan, D. G., Sadler, P. W.: New Potent Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Tetracthyl Pyrophosphate, *Nature*, 182 (1958) 1498.
22. Berry, W. K., Davies, D. R., Green, A. L.: Oximes of α - ω -diquaternary Alkane Salts as Antidotes to Organophosphate Anticholinesterases, *Brit. J. Pharmacol.*, 14 (1959) 186.
23. Scatfe, J. F.: Oxime Reactivation Studies of Inhibited True and Pseudo Cholinesterase, *Canad. J. Biochem.*, 37 (1959) 1301.

24. *Davies, D. R., Green, A. L.*: The Mechanism of Hydrolysis by Cholinesterase and Related Enzymes, *Advanc. Enzymol.*, 20 (1958) 283.
25. *Green, A. L., Smith, H. J.*: The Effect of Electrolytes on the Reactivation of Phosphorylated Cholinesterase, *Biochim. biophys. Acta*, 27 (1958) 212.
26. *Green, A. L., Smith, H. J.*: The Reactivation of Cholinesterase Inhibited with Organophosphorus Compounds. II. Reactivation by Pyridine Aldoxime Methiodides, *Biochem. J.*, 68 (1958) 32.
27. *Fleisher, J. H., Michel, H. O., Yates, L., Harrison, C. S.*: 1,1'- trimethylenebis (4-formylpyridinium bromide) dioxime (TMB-4) and 2-pyridine aldoxime methiodide (2-PAM) as Adjuvants to Atropine in the Treatment of Anticholinesterase Poisoning, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 129 (1960) 31.
28. *Hobbiger, F.*: Chemical Reactivation of Phosphorylated Human and Bovine True Cholinesterases, *Brit. J. Pharmacol.*, 11 (1956) 295.
29. *Berends, F., Posthumus, C. H., Sluys, I., Deierkauf, F. A.*: The Chemical Basis of the »Ageing Process« of DFP-Inhibited Pseudocholinesterase, *Biochim. biophys. Acta*, 34 (1959) 576.
30. *Emmelin, N., MacIntosh, F. C.*: The Release of Acetylcholine from Perfused Sympathetic Ganglia and Skeletal Muscles, *J. Physiol.*, 131, 477.
31. *Stewart, W. C.*: Accumulation of Acetylcholine in Brain and Blood of Animals Poisoned with Cholinesterase Inhibitors, *Brit. J. Pharmacol.*, 7 (1952) 270.
32. *Douglas, W. W., Paton, W. D. M.*: The Mechanisms of Motor End-plate Depolarization due to a Cholinesterase-inhibiting Drug, *J. Physiol.*, 124 (1954) 325.
33. *Grob, D.*: The Manifestations and Treatment of Poisoning due to Nerve Gas and Other Organic Phosphate Anticholinesterase Compounds, *Arch. inter. Med.*, 98 (1956) 221.
34. *Candole, C. A. de, Douglas, W. W., Evans, G. L., Holmes, R., Spencer, K. E. v., Torrance, R. W., Wilson, K. M.*: The Failure of Respiration in Death by Anticholinesterase Poisoning, *Brit. J. Pharmacol.*, 8 (1953) 466.
35. *Grob, D., Harvey, A. McG.*: The Effects and Treatment of Nerve Gas Poisoning, *Amer. J. Med.*, 14 (1953) 52.
36. *Collomp, J.*: Les trillons, *Bull. d'Inf. Tehn. Sci.*, 23/G, (1949) 1.
37. *Wood, J. R., Dickens, P. F. Jr., Rizzolo, J., Boyliss, M. W.*: citat Wills J. H.: Pharmacological Antagonists of the Anticholinesterase Agents, pogl. 20, u: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, 15. svezak, Springer-Verlag, Berlin, 1963.
38. *Fredriksson, T.*: Studies on the Percutaneous Absorption of Sarin and Two Allied Organophosphorus Cholinesterase Inhibitors, *Acta dermat.-venereol., Suppl.* 41 (1958) 1.
39. *Kilpatrick, M., Kilpatrick, M. L.*: The Hydrolysis of Diisopropyl Fluorophosphate, *J. Phys. coll. Chem.*, 53 (1949) 1871.
40. *Epstein, J., Rosenblatt, D. H.*: Kinetics of Some Metal ion - Catalyzed Hydrolyses of Isopropyl Methylphosphonofluoridate (GB) at 25°, *J. Amer. chem. Soc.*, 80 (1958) 3596.
41. *Wagner-Jauregg, T., Hackley, B. E. Jr., Lies, T. A., Owens, O. O., Proper, R.*: Model Reactions of Phosphorus-containing Enzyme Inactivators. VI. The Catalytic Activity of Certain Metal Salts and Chelates in the Hydrolysis of Diisopropyl Fluorophosphate, *J. Amer. Chem. Soc.*, 77 (1955) 922.
42. *Epstein, J., Rosenblatt, D. H., Demek, M. M.*: Kinetics of the Reaction of Isopropyl-Methylphosphonofluoridate with Catechols at 25°, *J. Amer. chem. Soc.*, 78 (1956) 341.
43. *Larsson, L.*: The Alkaline Hydrolysis of Two Sarin Analogues and of Tabun, *Acta chem. scand.*, 12 (1958) 783.
44. *Tammelin, L. E.*: Cholin Esters. Substrates and Inhibitors of Cholinesterases, *Svensk. Kem. Tidskr.*, 70 (1958) 157.
45. *Jandorf, B. J.*: Chemical Reactions of Nerve Gases in Neutral Solution. I. Reaction with Hydroxylamine, *J. Amer. chem. Soc.*, 78 (1956) 3686.

46. Green, A. L., Sainsburg, G. L., Saville, B., Stansfield, M.: The Reactivity of Some Active Nucleophilic Reagents with Organophosphorus Anticholinesterases, *J. chem. Soc.*, (1958) 1583.
47. Green, A. L., Saville, B.: The Reaction of Oximes with Isopropyl Methylphosphonofluoridate (Sarin), *J. chem. Soc.*, (1956) 3887.
48. Wills, J. H.: Pharmacological Antagonists of the Anticholinesterase Agents, pogl. 20, u: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, 15. sv., Springer-Verlag, Berlin, 1963.
49. Epstein, M. A., Freeman, G.: Toxicity of Hydroxamic Acid Analogues: Prophylactic and Therapeutic Efficacy Against Nerve Gas Poisoning in Mice, *Proc. Soc. exp. Biol.*, 92 (1956) 660.
50. Dultz, L., Epstein, M. A., Freeman, G., Gray, E. H., Weil, W. B.: Studies on a Group of Oximes as Therapeutic Compounds in Sarin Poisoning, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 119 (1957) 522.
51. Askew, B. M.: Oximes and Hydroxamic Acids as Antidotes in Anticholinesterase Poisoning, *Brit. J. Pharmacol.*, 11 (1956) 417.
52. King, T. O., Poulsen, E.: The Action of an Aldoxime (2-pyridine Aldoxime Methiodide) on Acute Alkylphosphate Poisoning in Mice, *Arch. int. Pharmacodyn.*, 114 (1958) 118.
53. Bay, E., Krop, S., Yates, L. F.: Chemotherapeutic Effectiveness of 1,1'-trimethylene bis (4-formyl-pyridinium bromide) Dioxime (TMB-4) in Experimental Anticholinesterase Poisoning, *Proc. Soc. exp. Biol.*, 98 (1958) 107.
54. Loewi, O., Navratil, E. (1926): citat po Wills, J. H.: Pharmacological Antagonists of the Anticholinesterase Agents, pogl. 20, u: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, 15. sv., Springer-Verlag, Berlin, 1963.
55. Koster, R.: Synergisms and Antagonisms Between Physostigmine and Di-isopropyl Fluorophosphate in Cats, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 88 (1946) 39.
56. Koelle, G. B.: Protection of Cholinesterase Against Irreversible Inactivation by DFP *in vitro*, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 88 (1946) 232.
57. Wills, J. H. (1955): citat Wills, J. H.: Pharmacological Antagonists of the Anticholinesterase Agents, pogl. 20, u: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, 15. sv., Springer-Verlag, Berlin, 1963.
58. Jaco, N. T., Wood, D. R. (1944): citat Wills, J. H.: Pharmacological Antagonists of the Anticholinesterase Agents, pogl. 20, u: *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, 15. sv., Springer-Verlag, Berlin, 1963.
59. Fleckensteint, A. (1955): citat Wills, J. H.: Pharmacological Antagonists of the Anticholinesterase Agents, pogl. 20, u: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, 15. sv., Springer-Verlag, Berlin, 1963.
60. McNamara, B. P., Koelle, G. B., Gliman, A.: The Treatment of DFP Poisoning in Rabbits, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 88 (1946) 27.
61. Balotin, N. M., Coon, J. M.: The Antagonism of Some Actions of TEPP by Morin, *Arch. int. Pharmacodyn.*, 123 (1960) 395.
62. Ambache, N.: The Peripheral Action of Clostridium botulinum Toxin, *J. Physiol.*, 108 (1949) 127.
63. Stern, P.: I. simpozij o antikolinesterazama, Zagreb, 1961, str. 3.
64. Kleinwächter, L. (1864): citat Wills, J. H.: Pharmacological Antagonists of the Anticholinesterase Agents, pogl. 20, u: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, 15. sv., Springer-Verlag, Berlin, 1963.
65. Fraser, T. R. (1870): citat Wills, J. H.: Pharmacological Antagonists of the Anticholinesterase Agents, pogl. 20, u: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, 15. sv., Springer-Verlag, Berlin, 1963.
66. Salerno, P. R., Coon, J. M.: A Pharmacologic Comparison of Hexaethyltetraphosphate (HETP) and Tetraethyl Pyrophosphate (TEPP) with Physostigmine, Neostigmine and DFP, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 95 (1949) 240.

67. *Lands, A. M.*: An Investigation of the Molecular Configuration Favorable for Stimulation of Blocade of the Acetylcholine-Sensitive Receptors of Visceral Organs, *J. Pharmacol.*, 102 (1951) 219.
68. *Grob, D., Harvey, A. McG.*: Observations on the Effects of Tetraethyl Pyrophosphate (TEPP) in Man, and on its Use in the Treatment of Myasthenia Gravis, *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 84 (1949) 532.
69. *Grob, D.*: Uses and Hazards of the Organic Phosphate Anticholinesterase Compounds, *Ann. int. Med.*, 32 (1950) 1229.
70. *Grob, D., Garlick, W. L., Harvey, A. McG.*: The Toxic Effects in Man of the Anticholinesterase Parathion (p-nitrophenol diethyl thionophosphate), *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 87 (1950) 106.
71. *Holmes, J. H., Kinzer, E. J., Hibbert, R. W.*: Parathion Poisoning Case Report, *Rocky MTN. med. J.*, 54 (1957) 1022.
72. *Heath, D. F.*: Organophosphorus Poisons, Pergamon Press, Oxford, 1961.
73. *Freeman, G., Epstein, M. A.*: Therapeutic Factors in Survival after Lethal Cholinesterase Inhibition by Phosphorus Insecticides, *New Engl. J. Med.*, 253 (1955) 266.
74. *Gordon, A. S., Frye, C. W.*: Large Doses of Atropine, Low Toxicity and Effectiveness in Anticholinesterase Intoxication, *J. Amer. med. Ass.*, 159 (1955) 1181.
75. *Douglas, W. W., Matthews, P. B. C.*: Acute Tetraethylpyrophosphate Poisoning in Cats and its Modification by Atropine or Hyoscine, *J. Physiol.*, 116 (1952) 202.
76. *Wright, P. G.*: An Analysis of the Central Peripheral Components of Respiratory Failure Produced by Anticholinesterase Poisoning in the Rabbit, *J. Physiol.*, 126 (1954) 52.
77. *Kunkel, A. M., Wills, J. H., Oikemus, A. H.*: Effect of a Quarternary Derivative of Atropine, N-benzyl Atropinium Chloride, *Proc. Soc. exp. Biol.*, 96 (1957) 791.
78. *Parkes, M. W., Sacra, P.*: Protection Against the Toxicity of Cholinesterase Inhibitors by Acetylcholine Antagonists, *Brit. J. Pharmacol.*, 9 (1954) 299.
79. *Modell, W., Krop, S., Hitchcock, P., Riker, W. F. Jr.*: General Systemic Actions of Diisopropyl Fluorophosphate (DFP) in Cats, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 87 (1946) 400.
80. *Deichmann, W. B., Rakoczy, R.*: Buscopan in Treatment of Experimental Poisoning by Parathion, Methyl Parathion and Systox, *A. M. A. Arch. industr. Hyg.*, 5 (1953) 44.
81. *Davies, D. R., Willey, G. L.*: The Toxicity of 2-hydroxy-iminomethyl-N-methylpyridinium Methanesulphonate (P₂S), *Brit. J. Pharmacol.*, 13 (1958) 202.
82. *O'Leary, J. F., Kunkel, A. M., Jones, A. H.*: Efficacy and Limitations of Oxime - Atropine Treatment of Organophosphorus Anticholinesterase Poisoning, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 132 (1961) 50.
83. *Kewitz, H., Wilson, I. B.*: A Specific Antidote Against Lethal Alkylphosphate Intoxication, *Arch. Biochem.*, 60 (1956) 261.
84. *Loomis, T. A.*: The Effect of an Aldoxime on Acute Sarin Poisoning, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 118 (1956) 123.
85. *Lehman, R. A., Nicholls, M. E.*: Antagonisms of Phospholine (Echothiophate) Iodide by Certain Quaternary Oximes, *Proc. Soc. exp. Biol.*, 104 (1960) 550.
86. *Ederly, H., Schatzberg-Porath, G.*: Prophylactic and Therapeutic Effects of Pyridine-2-Aldoxime Methiodide and Diacetyl Monoxime Against Poisoning by Organophosphorus Compounds, *Arch. int. Pharmacodyn.*, 121 (1959) 104.
87. *Namba, T.*: Toxicity of PAM (pyridine-2-aldoxime methiodide), *Naiika no Ryoiki*, 6 (1958) 437.
88. *Hobbiger, F., Sadler, P. W.*: Protection Against Lethal Organophosphate Poisoning by Quaternary Pyridine Aldoximes, *Brit. J. Pharmacol.*, 14 (1959) 192.
89. *Coleman, I. W., Little, P. E., Grant, G. A.*: Oral Prophylaxis for Anticholinesterase Poisoning, *Canad. J. Biochem.*, 39 (1961) 351.

90. *Crook, J. W., Cresthull, P., O'Neil, H. W., Oberst, F. W.*: Chronic Intravenous Toxicity of the Oximes of 2-formyl-1-methyl-pyridinium Chloride and the Methanesulphonate Analog to Dogs and Rabbits, *Tox. Appl. Pharm.*, **6** (1964) 310.
91. *Hobbiger, F., Pitman, M., Sadler, P. W.*: Reactivation of Phosphorylated Acetylcholinesterases by Pyridinium Aldoximes and Related Compounds, *Biochem. J.*, **75** (1960) 363.
92. *Askew, B. M., Davies, D. R., Green, A. L., Holmes, R.*: The Nature of the Toxicity of 2-oxo-Oximes, *Brit. J. Pharmacol.*, **11** (1956) 424.
93. *Sundwall, A.*: Plasma Concentration Curves of N-methylpyridinium-2-aldoxime Methane Sulphonate (P₂S) after Intravenous, Intramuscular and Oral Administration in Man, *Biochem. Pharmacol.*, **5** (1960) 225.
94. *Sundwall, A., Elwin, C. E.*: Absorption Studies on N-methyl-pyridinium-2-aldoxime Methanesulphonate (P₂S) in Dog and Man, *Acta physiol. scand.*, **50** (1960) 146.
95. *Sundwall, A.*: Minimum Concentrations of N-methylpyridinium-2-aldoxime Methane Sulphonate (P₂S) which Reverse Neuromuscular Block, *Biochem. Pharmacol.*, **8** (1961) 413.
96. *Duke, E. E., de Candole, C. A.*: Absorption of Injected Oximes, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **41** (1963) 2473.
97. *Kewitz, J., Nachmansohn, D.*: A Specific Antidote Against Lethal Alkyl Phosphate Intoxication. IV. Effect in Brain, *Arch. Biochem.*, **66** (1957) 271.
98. *Jager, B. V., Stagg, G. N., Green, N., Jager, L.*: Studies on Distribution and Disappearance of Pyridine-2-aldoxime Methiodide (PAM) and of Diacetyl Monoxime (DAM) in Man and in Experimental Animals, *Johns Hopk. Hosp. Bull.*, **102** (1958) 225.
99. *Schaumann, W.*: Maximal Inhibition of Cholinesterase in the Central Nervous System, *Brit. J. Pharmacol.*, **15** (1960) 432.
100. *Loomis, T. A., Welsh, M. J. Jr., Miller, G. T.*: A Comparative Study of Some Pyridinium Oximes as Reactivators of Phosphorylated Acetylcholinesterase and as Antidotes in Sarin Poisoning, *Toxicol. Appl. Pharm.*, **5** (1963) 588.
101. *Firemark, N., Barlow, C. F., Roth, L. J.*: The Penetration of 2-PAM-C¹⁴ into Brain and the Effect of Cholinesterase Inhibitors on its Transport, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **145** (1964) 252.
102. *Brown, R. V., Kunkel, A. M., Somers, L. M., Wills, J. H.*: Pyridine-2-aldoxime Methiodide in the Treatment of Sarin and Tabun Poisoning, with Notes on its Pharmacology, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **120**, (1957) 276.
103. *Rosenberg, P.*: *In vivo* Reactivation by PAM of Brain Cholinesterase Inhibited by Paraoxon, *Biochem. Pharmacol.*, **3** (1960) 212.
104. *Terzić, M., Milošević, M. P.*: Perzistencija N,N'-trimetilen-bis-(4-formil-piridinium-bromid)dioksima (TMB-4) u krvi pacova, *Arh. hig. rada*, **14** (1963) 87.
105. *Davies, D. R., Green, A. L.*: Results Quoted under Contributions to the General Discussion, u: *The Physical Chemistry of Enzymes*, *Disc. Faraday Soc.*, No. 20, (1955) 269.
106. *Hobbiger, F.*: Reactivation of Phosphorylated Acetylcholinesterase by Pyridine-2-aldoxime Methiodide, *Biochim. biophys. Acta*, **25** (1957) 652.
107. *Kewitz, J.*: A Specific Antidote Against Lethal Alkyl Phosphate Intoxication. III. Repair of Chemical Lesion, *Arch. Biochem.*, **66** (1957) 263.
108. *Hobbiger, F.*: Protection Against the Lethal Effects of Organophosphates by Pyridine-2-aldoxime Methiodide, *Brit. J. Pharmacol.*, **12** (1957) 438.
109. *Rutland, J. P.*: The Effect of Some Oximes in Sarin Poisoning, *Brit. J. Pharmacol.*, **13** (1958) 399.
110. *Namba, T., Hiraki, K.*: PAM (pyridine-2-aldoxime methiodide) Therapy for Alkylphosphate Poisoning, *J. Amer. med. Ass.*, **166** (1958) 1834.
111. *Svetličić, B., Vandekar, M.*: Therapeutic Effect of Pyridine-2-aldoxime Methiodide in Parathion Poisoned Mammals, *J. comp. Path.*, **70** (1960) 257.

112. *Karlog, O.*: Experimental Studies on the Effect of P-2-AM in Acute Poisoning with Alkyl Phosphate, *Nord. Vet. Med.*, **12** (1960) 37.
113. *Milošević, M., Terzić, M., Vojvodić, V.*: Protection Against Lethal Phosphamidone Poisoning by N,N'-trimethylene-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium bromide) (TMB-4), *Arch. int. Pharmacodyn.*, **132** (1961) 180.
114. *Cohen, E. M., Wiersinga, H.*: Oximes in the Treatment of Nerve Gas Poisoning. II, *Acta physiol. pharmacol. neerl.*, **9** (1960) 276.
115. *Holmstedt, B.*: Synthesis and Pharmacology of Dimethylamido-ethoxy-phosphoryl cyanide (Tabun) together with a Description of Some Allied Anticholinesterase Compounds Containing N-P bond, *Acta physiol. Scand.*, **25** (1951) Suppl. 90, 1.
116. *Holmstedt, B.*: Pharmacology of Organophosphorus Cholinesterase Inhibitors, *Pharmacol. Rev.*, **11** (1959) 567.
117. *Bethe, K., Erdmann, W. D., Lendle, L., Schmidt, G.*: Spezifische Antidot-Behandlung bei protrahierter Vergiftung mit Alkylphosphaten (Paraoxon, Parathion, DFP) und Eserin an Meerschweinchen, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.*, **231** (1957) 3.
118. *Lindgreen, P., Sundwall, A.*: Parasympatholytic Effects of TMB-4 (1,1-trimethylenebis(4-formylpyridinium bromide)-dioxime) and Some Related Oxime in the Cat, *Acta Pharmacol.*, **17** (1960) 69.
119. *Erdmann, W. D., Heye, D.*: Analyse der erregenden und lähmenden Wirkung von Alkylphosphaten (Parathion, Paraoxon, Systox) am isolierten Kaninchendarm, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.*, **232** (1958) 507.
120. *Holmes, R., Robins, E. L.*: The Reversal by Oximes of Neuromuscular Block Produced by Anticholinesterases, *Brit. J. Pharmacol.*, **10** (1955) 490.
121. *Fredriksson, T., Tibbling, G.*: Reversal of Effects on the Rat Nerve-Diaphragm Preparation Produced by Methylfluorophosphorylcholines, *Biochem. Pharmacol.*, **2** (1959) 63.
122. *Wills, J. H.*: Recent Studies of Organic Phosphate Poisoning, *Fed. Proc.*, **18** (1959) 1020.
123. *Sakai, F., Del Ri, H., Erdmann, W. D., Schmidt, G.*: Über die Atemlähmung durch Parathion oder Paraoxon und ihre antagonistische Beeinflussbarkeit, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.*, **234** (1958) 210.
124. *Brown, R. V.*: The Effects of Intracysternal Sarin and Pyridine-2-aldoxime methyl Methanesulphonate in Anaesthetized Dog, *Brit. J. Pharmacol.*, **15** (1960) 170.
125. *Longo, V. G., Nachmansohn, D., Bovet, D.*: Aspect électroencéphalographiques de l'antagonisme entre le iodométhyrate de 2-pyridine aldoxime (PAM) et le méthylfluorophosphate d'isopropyle (Sarin), *Arch. int. Pharmacodyn.*, **123** (1960) 282.
126. *Karlog, O., Nimb, M., Poulsen, E.*: Treatment of Parathion (Bladan) Poisoning with 2-PAM (pyridil-(2)-aldoxime-N-methyl (iodide), *Ugeskr. Laeg.*, **120** (1958) 177.
127. *Funches, A. J.*: Treatment of Severe Poisoning with 2-pyridine-aldoxime Methiodide (2-PAM), *Arch. Environ. Health.*, **1** (1960) 404.
128. *Schuchter, A., Kawel, H. G., Schneider, J.*: Kombinierte Behandlung einer Vergiftung durch Diäthyl-p-nitrophenylthiophosphat mit Pyridin-aldoxim-(2)methojodid and Atropin, *Arzneimittel-Forsch.*, **10** (1960) 399.
129. *Wills, J. H., Kunkel, A. M., Brown, R. V., Groblewski, G. E.*: Pyridine-2-aldoxime Methiodide and Poisoning by Anticholinesterases, *Science*, **125** (1957) 743.
130. *Davies, D. R., Green, A. L.*: The Chemotherapy of Poisoning by Organophosphate Anticholinesterases, *Brit. J. Industr. Med.*, **16** (1959) 128.
131. *Davies, D. R., Green, A. L., Willey, G. L.*: 2-hydroxyiminomethyl-N-methyl-pyridinium Methanesulphonate and Atropine in the Treatment of Severe Organophosphate Poisoning, *Brit. J. Pharmacol.*, **14** (1959) 5.
132. *Wilson, I. B., Sondheimer, F.*: A Specific Antidote Against Lethal Alkyl Phosphate Intoxication. V. Antidotal Properties, *Arch. Biochem.*, **69** (1957) 468.
133. *Sanderson, D. M., Edson, E. F.*: Oxime Therapy in Poisoning by Six Organophosphorus Insecticides in the Rat, *J. Pharm.*, **11** (1959) 721.

134. *Cohen, E. M., Wiersinga, H.*: Oximes in the Treatment of Nerve Gas Poisoning, *Acta physiol. pharmacol. neerl.*, 8 (1959) 40.
135. *Rosen, F.*: Toxic Hazards; Parathion, *New Engl. J. Med.*, 262 (1960) 1243.
136. *Quinby, G. E., Clappison, G. B.*: Parathion Poisoning: A Near Pediatric Case Treated with Pyridine Aldoxime Methiodide (2-PAM), *Arch. Environ. Health*, 3 (1961) 538.
137. *Erdmann, W. D., Sakai, F., Scheler, F.*: Erfahrungen bei der spezifischen Behandlung einer E-605 Vergiftung mit Atropin und dem Esterasereaktivator PAM, *Deutsch. Med. Wschr.*, 83 (1958) 1359.
138. *Erdmann, W. D.*: Parathion (E-605) Poisoning Treated with the Antidote PAM (pyridine-2-aldoxime methiodide): Some Illustrative Cases, *Germ. Med. Monthly*, 5 (1960) 304.
139. *Quinby, G. E.*: Further Therapeutic Experience with Pralidoximes in Organic Phosphorus Poisoning, *J. A. M. A.*, 187 (1964) 202.
140. *Erdmann, W. D., von Clarmann, M.*: Ein neuer Esterase-Reaktivator für die Behandlung von Vergiftungen mit Alkylphosphaten, *Dtsch. med. Wschr.*, 88 (1963) 2201.
141. *Erdmann, W. D., Engelhard, H.*: Pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen mit dem Dichlorid des Bis-(4-hydroxyiminomethyl-pyridinium-(1)-methyl)-äthers, einem neuen Esterase-Reaktivator, *Arzneimittel-Forsch.*, 14 (1964) 5.
142. *Engelhard, H., Erdmann, W. D.*: Ein neuer Reaktivator für durch Alkylphosphat gehemmte Acetylcholinesterase, *Klin. Wschr.*, 41 (1963) 525.
143. *Staudacher, H. L.*: Erfolgreiche Behandlung einer E-605-Vergiftung mit einem neuen Cholinesterase-Reaktivator, *Arztliche Forsch.*, 17 (1963) 441.
144. *Bisa, K., Fischer, G., Müller, O., Oldiges, H., Zoch, E.*: Die Antidotwirkung von Bis-(4-hydroxyiminomethyl-pyridinium-(1)-methyl)-äther-dichlorid bei mit Alkylphosphat vergifteten Ratten, *Arzneimittel-Forsch.*, 14 (1964) 85.

Summary

THE THERAPY OF ORGANOPHOSPHORUS POISONING WITH PARTICULAR REGARD TO THE APPLICATION OF REACTIVATORS OF THE INHIBITED CHOLINESTERASE

Basic data on the mechanism of cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and the properties of the inhibited enzyme have been presented. The mechanism of reactivation of the inhibited cholinesterase has been dealt with in detail and particular attention has been paid to therapeutic measures applied today in the case of organophosphorus poisoning.

*Institute for Medical Research
incorporating the Institute of Industrial
Hygiene, Zagreb*

*Received for publication
September 23, 1965.*