

UTICAJ NEKIH REAKTIVATORA ChE  
NA AKTIVNOST POPREČNO-PRUGASTE  
MUSKULATURE IN VIVO  
(M. MASSETER ŠTAKORA)

B. BOŠKOVIĆ i P. STERN

*Institut za farmakologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo*

*(Priljeno 9. X 1963)*

Istražen je uticaj niza reaktivatora holinesteraze te 3-dietilamino-etil-difenil propilacetata (SKF-525 A) i hemiholina (HC-3) na aktivnost poprečno-prugaste muskulature štakora *in vivo*. Svi istraženi spojevi smanjuju kontrakcije masetera štakora izazvane sa 2,4 diklorfenoksi acetatom (2,4 D). Dobiveni rezultati diskutovani su u vezi sa direktnim delovanjem reaktivatora i holinergičnom inervacijom poprečno-prugaste muskulature.

U vezi sa delovanjem reaktivatora holinesteraze (ChE) postoje dva mišljenja. Po mišljenju jednih autora ti spojevi deluju povoljno kod trovanja organo-fosfornim jedinjenjima (OFJ) putem reaktivacije inhibiranog enzima i putem inter-reakcije (1). Po mišljenju drugih, povoljan zaštitni efekat reaktivatora ChE nije u vezi samo sa reaktivacijom i inter-reakcijom, već ti spojevi imaju i druga, takozvana direktna delovanja. Tako su *Homes* i *Robins* (2) još 1955. godine našli da oksimi imaju direktno toksično delovanje na poprečno-prugastu muskulaturu izazivajući smanjenje visine kontrakcije i usporenje brzine kondukcije, a piridinijum-2-aldoksimetiljodid (PAM-2)) u većim koncentracijama izaziva neuromuskularni blok. *Grob* i *Johnes* (3) su kod PAM-2 ustanovili na ljudima posle intraarterijalne injekcije depresiju neuromuskularne transmisije. Prema nalazu *Ederija* (4), diacetil-monoksim (DAM) deluje direktno na motornu ploču izazivajući neuromuskularni blok. *Koelle* (5) je također mišljenja da treba imati u vidu i druga delovanja reaktivatora kod tumačenja zaštitnih efekata ovih spojeva. Iz navedenih razloga mi smo istražili uticaj nekih reaktivatora kao i 3-dietilamino etil-difenilpropilacetata (SKF-525A) i hemiholina (HC-3) na aktivnost poprečno-prugaste muskulature štakora *in vivo*. Ispitani su ovi spojevi:

1. PAM-2
2. PAM-3 + (piridinijum-3-aldoksim metiljodid)
3. PAM-4 + (piridinijum-4-aldoksim metiljodid)
4. PAM-Cl + (piridinijum-2-aldoksim metilhlorid)
5. P<sub>2</sub>-S + (piridinijum-2-aldoksim metansulfonat)
6. TMB-4 (N,N-trimetilen bis-)-4 formilpiridinijum bromid dioksim)
7. C-4-dioksim-1,4 bis (piridinijum aldoksim) butan dibromid

8. DINA + (diizonitrozo aceton)
9. MINA + (monoizonitrozo aceton)
10. DAM (diacetyl monoksim)
11. p-NFAH (-p-nitrofenil acethidroksamska kiselina)
12. BH (Benzilhidroksamska kiselina)
13. SKF-525 A
14. HC-3

#### METODA

U eksperimentima su upotrebljeni beli štakori, oba spola, težine 200-300 grama. Rađeno je po metodi *Eicholtza* (6), u nembutalskoj narkozi. Svježe otopine ispitanih spojeva davane su intraperitonealno, u volumenu od 10 ml/kg težine. Kontraksije masetera registrovane su na kimo grafu 15 i 30' nakon injiciranja supstancija. Vreme registracije 1 minut. Kada je davan 2,4 diklor fenoksi acetat (2,4 D) kontraksije su registrovane posle 1 sat, a zatim isto 15 i 30 minuta nakon ispitivanih spojeva.

#### REZULTATI

Prvo je ispitan uticaj navedenih spojeva na aktivnost normalnog masetera. Svi spojevi su davani u 3 doze. Iz visine kontraksije i logaritma doze izračunate su doze u mg/kg, koje smanjuju kontraksije masetera normalnog štakora na 50% od prvobitne aktivnosti.

Tabela

R. br.	Supstanca	mg/kg <sup>1</sup>	Miotonična reakcija mišića	
			1h iza 2, 4, D <sup>2</sup>	15 i 30' iza supstance 1-14
1.	PAM-2 . . . . .	20	**	0
2.	PAM-3 . . . . .	100	**	0
3.	PAM-4 . . . . .	8,7	**	0
4.	PAM-Cl . . . . .	50	**	0
5.	P-25 . . . . .	100	**	0
6.	TMB-4 . . . . .	22,4	**	0
7.	TMB-4 sa $-(CH_2)_4-$ . . . . .	24,8	**	0
8.	DINA . . . . .	17,5	**	0
9.	MINA . . . . .	73	**	0
10.	DAM . . . . .	20	**	0
11.	p-NFAH . . . . .	20,8	**	0
12.	BH . . . . .	45	**	0
13.	SKF-525 A . . . . .	37,5	**	0
14.	HC-3 . . . . .	0,033	**	0

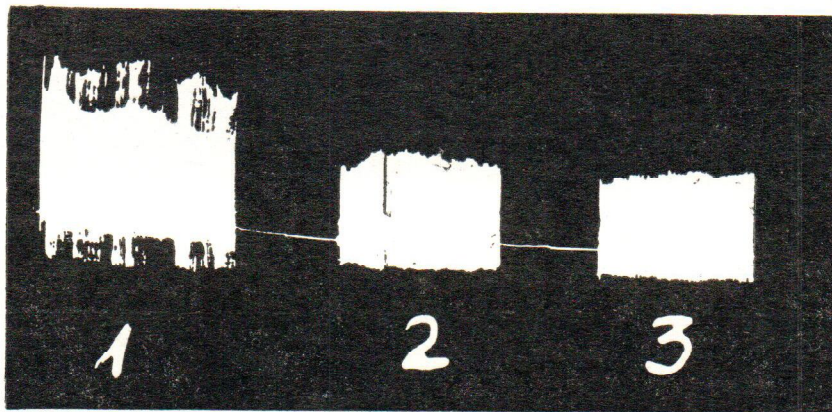
<sup>1</sup> Doza u mg/kg ip koja smanjuje kontraksije normalnog mišića za 50% od prvobitne aktivnosti.

<sup>2</sup> 2,40 400 mg/kg ip.

\*\* = Intenzitet miotoničke reakcije mišića.

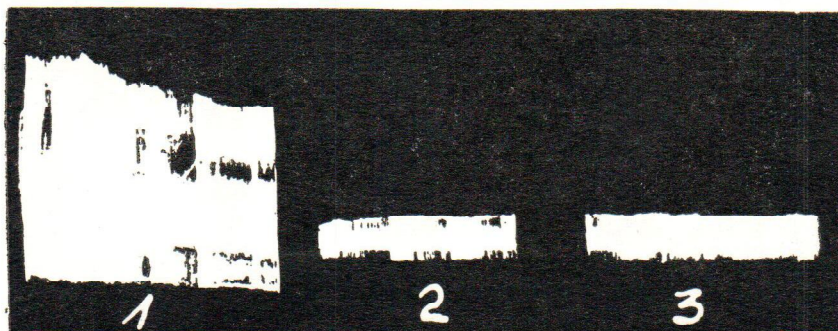
0 = Nedostatak miotoničke reakcije.

Pošto smo ustanovili da ispitane supstancije imaju uticaj na aktivnost masetera, za daljnje eksperimente smo odabrali 2,4 diklor fenoksi acetat (2,4 D), za koji je poznato da izaziva stanje slično kongenitalnoj miotoniji kod laboratorijskih životinja, pa i kod štakora (7, 8). Ovaj spoj bio je pogodan zato što izaziva hiperaktivnost poprečnoprugaste muskulature delujući direktno na mišićno vlakno. Za 2,4 D je poznato da nema uticaja na metabolizam acetilholina (ACh). Nema uticaja na ChE, a mi smo pokazali da nema uticaja ni na holinacetilazu (HAc) (9). Jedan sat iza davanja 2,4 D razvila se miotonička reakcija, koja je ukinuta iza davanja reaktivatora, SKF-525 A i HC-3.



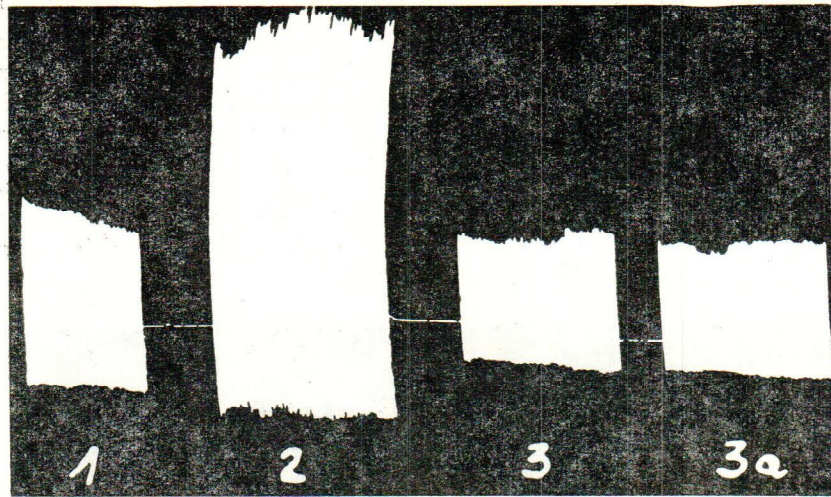
Slika 1

1. Normalna kontrakcija
2. 15 min. iza 20 mg/kg TMB-4
3. 30 min. iza 20 mg/kg TMB-4



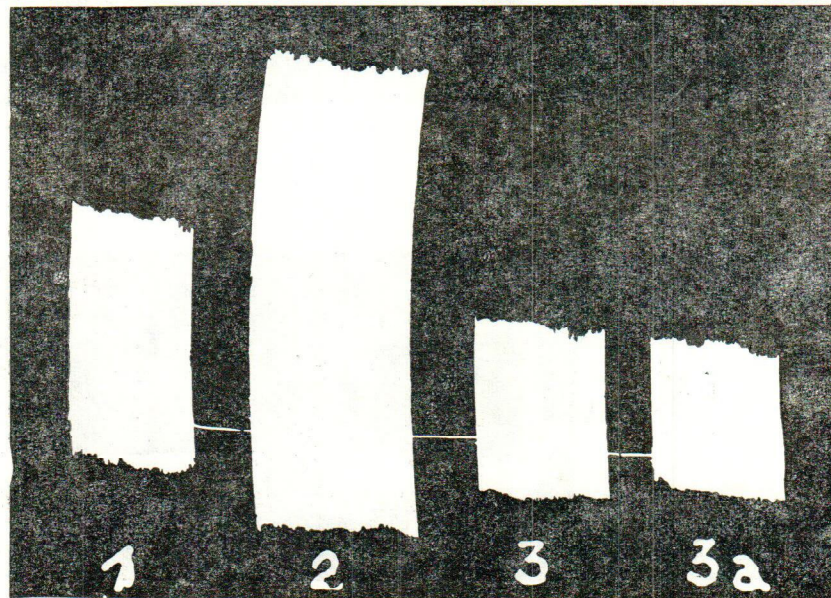
Slika 2

1. Normalna kontrakcija
2. 15 min. iza 100 mg/kg DAM
3. 30 min. iza 100 mg/kg DAM



Slika 3

1. Normalna kontrakcija
2. 1 sat iza 2,4 D
3. i 3a. 15, odnosno 30 min. iza PAM-3



Slika 4

1. Normalna kontrakcija
2. 1 sat iza 2,4 D
3. i 3a. 15, odnosno 30 min. iza TMB-4

## DISKUSIJA

*Ederly* (10) je pokazao da je dimetil-benzo-triazin-ditiofosfat (DBD) toksičan spoj za miša, ali da vrlo slabo inhibira ChE in vivo. Uginule životinje pokazivale su vrednosti preko 60% od normalne aktivnosti, a ista je aktivnost zapažena kod preživelih i uginulih životinja koje su prethodno tretirane sa PAM-2. PAM-2 i DAM su, međutim, efikasni kod trovanja DBD-om, što autor pripisuje direktnom delovanju ovih oksima. *Milošević* (11) i saradnici nisu mogli također da ustanove korelaciju između zaštitnog efekta N,N-trimetilen bis-(-4 formilpiridinium bromid) dioksima (TMB-4) kod trovanja fosfamidonom i aktivnosti ChE.

U vezi sa delovanjem grupe PAM i derivata, pored nalaza *Holmesa* i *Robinsa* (2) da PAM deluje direktno na mišično vlakno, treba spomenuti i nalaz *Wislickog* (12), prema kome PAM-2 deprimira ne samo indirektnu podražljivost mišića već u manjoj meri i direktnu. PAM-4 se u našim eksperimentima pokazao najefikasnijim. Ispitujući uticaj derivata PAM-a na *ductus deferens - nervus hypogastricus*, mogli smo ustanoviti da PAM-4 na ovom pretežno adrenergički inerviranom preparatu ima izrazito stimulirajuće dejstvo za razliku od drugih derivata PAM-a, koji su bez efekta na pomenutom preparatu (13). Za TMB-4 je poznato da ima kurariformno i atropinu slično delovanje (14-16), a deluje i hipotenzivno (17, 18). Što se tiče grupe DINA-MINA-DAM treba istaknuti da je DAM najviše ispitivan od drugih autora. *Ederly* (4) je mišljenja da DAM deluje direktno na motornu ploču izazivajući neuromuskularni blok. Jako deprimira mišičnu kontrakciju, i to iza direktne i indirektno stimulacije. Osim toga, *Gaboure* (19, 20) je pokazao da DAM ima i direktna centralna delovanja. Blokira konvulzivne i letalne efekte metrazola na mišu i štakoru i konvulzivne efekte barbiturata. *Fouloux* (21) je našao da MINA ima direktna antinikotinska delovanja. BH i p-NFAH spadaju u inhibitore CoA. Mi smo mogli ustanoviti da hidroksamske kiseline jače inhibiraju CoA od odgovarajućih karbonskih kiselina (22). Kako funkcija poprečno-prugaste muskulature zavisi od tonusa holinergičnog nervnog sistema, to je i smanjenje kontrakcije posle BH i p-NFAH verovatno u vezi sa smanjenom aktivnošću holinergičnog nervnog sistema. Ovo se može reći i za SKF-525 A i HC-3. SKF-525 A je poznati inhibitor mnogih enzima i enzimskih sistema (23), pa i HAc (24). U najnovije vreme je nađeno da SKF-525 A ima direktno delovanje na motornu ploču (25). Mi smo također ustanovili da *m. rectus abdominis* žabe daleko slabije reagira na AcH, ako je prethodno bio neko vreme izložen delovanju otopine SKF-a (13). Ovaj spoj također jako koči kontrakcije preparacije mokraćni mehur - n. pelvicius, dražene električnim putem (13). HC-3 je poznati inhibitor HAc. Odnosno, danas se zna da ovaj spoj indirektno inhibira HAc putem blokade sistema za transport holina (26). I za ovaj spoj je poznato da aktivno deluje na poprečno-prugastu muskulaturu (27).

Rezultati izvedenih eksperimenata pokazuju da ispitani spojevi imaju direktno dejstvo na poprečno-prugastu muskulaturu štakora i mogu da posluže kao dalji prilog mehanizmu direktnog delovanja reaktivatora ChE. Danas se nakupilo već dovoljno eksperimentalnih dokaza o direktnom delovanju reaktivatora, tako da je lakše tumačiti razliku između dobrog zaštitnog efekta ovih spojeva i bez uticaja na inhibiranu ChE.

#### ZAKLJUČAK

Reaktivatori holinesteraze, SKF-525 A i HC-3 smanjuju kontrakcije *m. masetera* štakora, draženog električnim putem i uklanjaju miotoničnu reakciju mišića izazvanu sa 2,4 diklorfenoksi acetatom.

Dobiveni rezultati diskutovani su u vezi sa direktnim delovanjem reaktivatora holinesteraze i holinergičnom inervacijom poprečno-prugaste muskulature.

#### LITERATURA

1. Kewitz H., I. B. Wilson, D. Nachmansohn: Arch. Biochem. Biophys. 64 (1956) 456.
2. Holmes R., L. E. Robins: Brit. J. Pharmacol. 10 (1955) 490.
3. Grob D., I. R. Johns: J. Am. Med. Ass. 166 (1958) 1855.
4. Edery H.: Brit. J. Pharmacol. 14 (1959) 317.
5. Rajapurkar M. V., I. B. Koelle: J. Pharmacol. Exp. Therap. 123 (1958) 247.
6. Eichholtz F., Hotovy R. R., H. Erdniss: Arch. int. Pharmacodyn. 80 (1949) 62.
7. Bucher R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 63 (1946) 204.
8. Eyzaguirre E., B. Folk, K. Zierler, L. J. Lilienthal Jr.: J. Physiol. (London) 135 (1948) 69.
9. Stern P., B. Bošković: Neobjavljeni podaci.
10. Edery H., G. Schatzberg-Porath: Arch. int. Pharmacodyn. 121 (1959) 104.
11. Milošević P. M., M. Terzić, V. Vojvodić: Arch. int. Pharmacodyn. 132 (1961) 180.
12. Wislicki L.: Arch. int. Pharmacodyn. 129 (1960) 1.
13. Bošković B.: Neobjavljeni podaci.
14. Lehman A. R.: Brit. J. Pharmacol. 18 (1962) 287.
15. Hobbiger E., W. P. Sadler: Brit. J. Pharmacol. 14 (1959) 192.
16. Milošević M., M. Terzić, B. Vasić: Voj. San. Pregled 11 (1960) 1143.
17. Wellhöner H. H., W. D. Wiczorek, C. Morgenstern, M. Maschaour: Medicina Experimentalis 5 (1961) 49.
18. Milošević M.: Privatno saopštenje.
19. Gabourel J. D.: Biochem. Pharmacol. 5 (1961) 283.
20. Gabourel J. D., I. P. Comstock: J. Pharmacol. Exp. Therap. 137 (1962) 122.
21. Foulhoux N.: C. r. soc. biol. 152 (1958) 1116.
22. Bošković B., Z. Fuks, P. Stern: Naučno društvo NRB i H, Radovi 17 (1961) 85.

23. Brodie B.: J. Pharm. Pharmacol. 8 (1956) 1.
24. Kuriaki K., H. Marino: Jap. J. Pharmacol. 8 (1959) 96.
25. Della Bella D., F. Rognoni, M. Teotino: Brit. J. Pharmacol. 18 (1962) 563.
26. Schuler W. F.: »The Mechanism of Action of Hemicholiniums«. Int. Rev. Neurobiol., Academic Press, New York, London, 1960.
27. Desmedt E. I.: Nature, 182 (1958) 1673.

#### Summary

### EFFECT OF SOME REACTIVATORS OF CHOLINESTERASE ON THE ACTIVITY OF THE RAT'S STRIATED MUSCLE IN VIVO

The effect of a series of the reactivators of cholinesterase and 3-diethylamino-ethyl-diphenil propilacetate (SKF-525 A) and hemicholine (HC-3) on the activity of the rat's striated muscle *in vivo* has been examined. All the compounds examined decrease contractions of *M. masseter* produced by 2,4 dichlorphenoxi acetate (2,4 D). The results obtained are discussed in connection with the direct effect of reactivators and also with the cholinergic innervation of striated muscles.

*Institute of Pharmacology, Medical Faculty,  
Sarajevo*

*Received for publication  
October 9, 1963*