

PERZISTENCIJA N, N'-TRIMETILEN-BIS-  
- (4-FORMILPIRIDINIJUM-BROMID)  
DIOKSIMA (TMB-4) U KRVI PACOVA

M. TERZIĆ i M. P. MILOŠEVIĆ

*Farmakološki institut, Medicinski fakultet, Beograd*

*(Priljeno 12. VII 1963)*

Nadovezujući na ranija ispitivanja autori su ispitali perzistenciju TMB-4 u krvi pacova i utjecaj hepatektomije, nefrektomije i metaboličkog inhibitora CFT 1201 na brzinu eliminacije oksima u krvi. Rezultati pokazuju da se kod pacova najveći deo ubrizganog TMB-4 izlučuje preko bubrega u aktivnom obliku. Jetra nema značajnijeg udela u inaktivaciji ovog oksima.

Kvaternarni piridinijumski oksimi, pralidoksim (PAM-2) i N, N'-trimetilen-bis-(4-formilpiridinijum-bromid) dioksim (TMB-4), pretstav-organofosforim antiholinesterazama (13). Oba ova oksima deluju kao ljaju, zajedno sa atropinom, najpouzdanije antidote u terapiji trovanja snažni reaktivatori holinesteraze inhibisane organofosforim antiholinesterazama i na taj način uklanjaju osnovnu biohemijsku leziju koju pruzrokuju organofosforne supstancije.

Za uspešnu terapijsku primenu oksima neophodno je, pored njihovog reaktivatorskog dejstva, poznavati i druge farmakološke osobine, kao i način njihove raspodele i inaktivacije u organizmu, od čega, pored ostalog, zavisi i trajanje njihovog dejstva. Mehanizam metaboličke transformacije pralidoksima proučavalo je više autora (6, 2, 5). O sudbini TMB-4 ne postoje podaci u literaturi, iako ovaj oksim ispoljava znatna preimućstva nad pralidoksimom.

Naša ranija ispitivanja (9) pokazala su da je protektivni efekt TMB-4 srazmerno kratkotrajan. U ovom radu ispitivali smo stoga perzistenciju TMB-4 u krvi pacova, kao i uticaj hepatektomije, nefrektomije i metaboličkog inhibitora CFT 1201 na brzinu eliminacije oksima iz krvi.

## NAČIN RADA

U svim ogledima upotrebljeni su pacovi, oba pola, teški 150 do 200 grama.

Parcijalna hepatektomija (oko 75% tkiva) i bilateralna nefrektomija izvedene su u etarskoj narkozi 24, odnosno jedan sat pre administracije oksima. Hepatektomisane životinje dobile su postoperativno 15 ml 5% glikoze u rastresito potkožno tkivo. Dietilaminoetilestar fenildialilsirćetne kiseline (CFT 1201) u obliku hidrohlorida rastvoren je u 0.9% NaCl i ubrizgan intraperitonealno u dozi od 50 mg/kg, jedan sat pre aplikacije oksima.

TMB-4 (t. t. 222° C) dat je intravenski u dozi od 15 mg/kg, što odgovara približno 1/4 LD<sub>50</sub>. Volumen ubrizgane tečnosti iznosio je ml/kg.

Koncentracija oksima u krvi određivana je spektrofotometrijski (Beckmann DU spektrofotometar) po metodi koju su opisali *Creasy* i *Green* (2). Gustina svetlosti merena je pri talasnoj dužini od 335 m $\mu$  što odgovara prethodno određenom području maksimalne apsorpcije (12). Za analizu je upotrebljeno po 2 ml heparinizovane krvi dobijene iz karotidne arterije životinja koje su žrtvovane 30 i 60 minuta posle injekcije oksima. Kontrolne životinje iskrvavljene su i u drugim vremenskim razmacima.

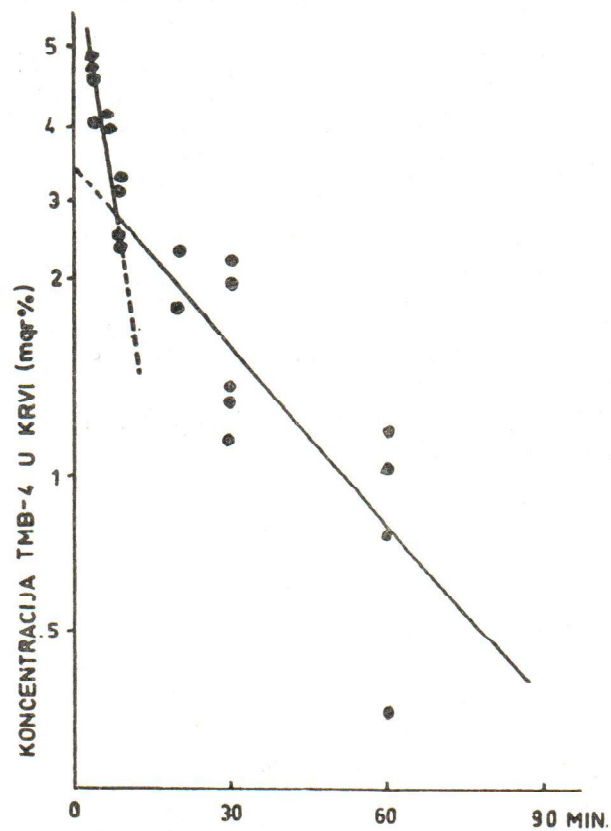
Intraperitonealna LD<sub>50</sub> TMB-4 i njena standardna greška određivana je po metodi koju su opisali *Miller* i *Tainter* (8). U ovim ogledima upotrebljeni su normalni pacovi, kao i pacovi kod kojih je prethodnim ubrizgavanjem nerazblaženog tetrahloruglijka (0.3 ml/100 g) izazvano akutno oštećenje jetre (verifikovano histološki). Procent uginulih životinja procenjivan je 6 časova posle injekcije oksima.

Prisustvo aktivnih koncentracija TMB-4 u mokraći pacova tretiranih ovim oksimom ispitivano je biološki na miševima otrovanim smrtnom dozom (2 LD<sub>50</sub>) paraoksiona (dietil-p-nitrofenilfosfata). Neposredno pre supkutane injekcije otrova miševima je ubrizgano intraperitonealno 0.2 ml nerazblažene mokraće pacova. Protektivni efekt TMB-4 procenjivan je 6 sati posle injekcije paraoksiona.

## REZULTATI

Na sl. 1 prikazane su na ordinati, logaritamski podeljenoj, koncentracije TMB-4 u krvi pojedinih pacova žrtvovanih u raznim vremenskim intervalima posle intravenske injekcije 15 mg/kg oksima. Kao što se vidi, u toku prvih desetak minuta posle injekcije, nivo TMB-4 naglo opada zahvaljajući difuziji oksima iz krvi u tkiva. Posle 10 do 20 minuta uspostavlja se relativno ravnomerna raspodela oksima u krvi i tkivima, a zatim započinje funkcija eliminacije, i iščezavanje oksima iz krvi teče pravolinijski. Regresivna linija opadanja nivoa TMB-4 je tačno odre-

đena i matematički definisana jednačinom:  $\log C \text{ (mg\%)} = -0.0099 t \text{ (min)} + \log 3.442$ . Vrednost 0.0099 u ovoj jednačini označava nagib prave i pokazuje prosečnu koncentraciju oksima (mg %) koji se eliminiše iz krvi u toku jednog minuta.



Sl. 1. Iščezavanje TMB-4 iz krvi pacova posle intravenske injekcije 15 mg/kg oksima

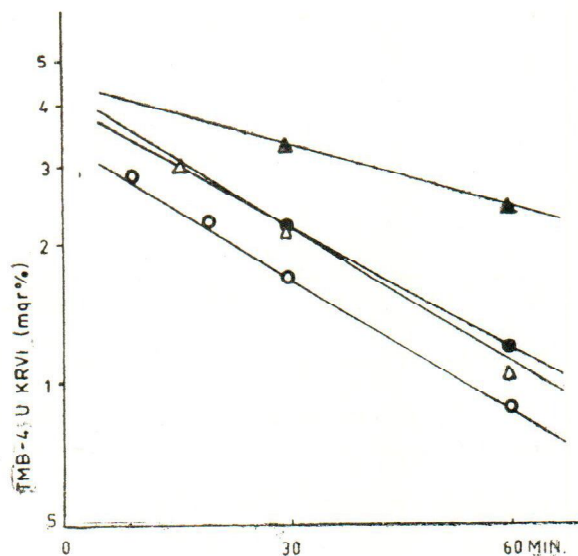
Na osnovu nađenih koncentracija TMB-4 u krvi pacova, matematički su dobijene i sledeće vrednosti (4):

|                                |                           |
|--------------------------------|---------------------------|
| »Apsolutni« raspodelni volumen | 58,3 cm <sup>3</sup>      |
| Relativni raspodelni volumen   | 0.29 cm <sup>3</sup> /g   |
| Konstanta eliminacije (k)      | 0.0230 min <sup>-1</sup>  |
| Biološko poluvreme (t/2)       | 28.6 min                  |
| Ukupni Clearance               | 1.34 cm <sup>3</sup> /min |

Uprkos izvesnim razumljivim ograničenjima, pojam raspodelnog volumena koje je uveo *Dost*, omogućuje da se sa izvesnom pouzdanošću zaključi o veličini onog dela ukupne zapremine tela u kojoj se raspodeljuje ubrizgana supstancija. Vrednosti dobijene za TMB-4 ukazuju da se ovaj oksim raspodeljuje prvenstveno u ekstracelularnoj tečnosti organizma.

Nađeni podaci daju takođe izvesnu pretstavu o brzini eliminacije TMB-4. Tako, na primer, dobijena vrednost za biološko poluvreme pokazuje da se koncentracija oksima u krvi, po uspostavljanju difuzione ravnoteže, smanjuje na polovinu početne vrednosti u toku približno pola sata. Ukupni Clearance (tzv. Slope Clearance), pojam koji su prvi uveli *Newman, Brodley i Winternitz* (11), pruža takođe izvesno merilo o sposobnosti celokupnog organizma da eliminiše ubrizganu supstanciju, nasuprot renalnom klirensu koji pokazuje samo kolika je aktivnost bubrega u eliminaciji leka. Dobijena vrednost ukupnog klirensa za TMB-4 ukazuje na relativno brzu eliminaciju oksima, ali se na osnovu nje ne može, naravno, ništa zaključiti o mehanizmu koji je odgovoran za brzu eliminaciju oksima.

Izvesnu ideju o tome pruža sl. 2 u kojoj su prikazane regresivne linije iščezavanja TMB-4 iz krvi kod:



Sl. 2. Iščezavanje TMB-4 iz krvi pacova posle administracije CFT 1201 (●), hepatektomije (△) i nefrektomije (▲). Prazni kružići označuju kontrole. Za svaku tačku upotrebljeno je 3-5 pacova. Doza TMB-4 15 mg/kg i. v.

1. normalnih pacova,
2. kod pacova koji su 1 sat pre intravenske injekcije oksima dobili intraperitonealno 50 mg/kg CFT 1201,
3. kod pacova kod kojih je 24 sata ranije izvršena parcijalna hepatektomija,
4. kod pacova kod kojih je 1 sat pre administracije oksima izvršena bilateralna nefrektomija.

Konstante brzine eliminacije (K) i poluvreme ( $t/2$ ) TMB-4 u svakom od ova četiri slučaja prikazana su u Tabl. 1. Kao što se vidi, TMB-4 u krvi nefrektomisanih životinja iščezava znatno sporije nego kod normalnih životinja. Međutim, kod hepatektomisanih životinja, kao i kod

Tabl. 1. Brzina iščezavanja TMB-4 iz krvi pacova.  
(k = konstanta brzine eliminacije,  $t/2$  = biološko poluvreme)

| Tretman                 | k                     | $t/2$  | Produženje<br>$t/2$ |
|-------------------------|-----------------------|--------|---------------------|
|                         | ( $\text{min}^{-1}$ ) | (min.) | (%)                 |
| Kontrole . . . . .      | 0.0230                | 28.6   | —                   |
| CFT 1201 . . . . .      | 0.0208                | 30.8   | 4.8                 |
| Hepatektomija . . . . . | 0.0215                | 29.7   | 3.1                 |
| Nefrektomija . . . . .  | 0.0070                | 91.3   | 219.3               |

životinja tretiranih CFT 1201, poluvreme je praktički isto kao i kod kontrolnih životinja.

Podaci navedeni u Tabl. 2 i 3 pokazuju takode da su bubrezi od daleko većeg značaja za eliminaciju TMB-4 nego jetra.

Tabl. 2. Akutna toksičnost TMB-4 kod pacova 24 časa posle injekcije tetrahlorugljenika (0,3 ml/100 g)

| TMB-4<br>(mg/kg, i. p.)              | Smrtnost (%)          |                        |
|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|
|                                      | Kontrole              | $\text{CCl}_4$         |
| 100                                  | 20                    | —                      |
| 120                                  | 20                    | 0                      |
| 140                                  | 40                    | 30                     |
| 160                                  | 80                    | 60                     |
| 180                                  | 100                   | —                      |
| LD50 $\pm$ S. E.<br>(Broj životinja) | 130 $\pm$ 8.2<br>(25) | 152 $\pm$ 10.5<br>(20) |

Tabl. 3. Zaštitni efekt mokraće pacova tretiranih TMB-4 kod miša otrovanog dvostrukom LD50 paraoksiona

| Mokraća pacova<br>posle injekcije: | % miševa zaštićenih mokraćom<br>skupljenom u toku: |        |          |          |
|------------------------------------|--|--------|----------|----------|
|                                    | 30 min.  | 1 sata | 2-3 sata | 3-4 sata |
| NaCl 0.9%                          | 0  | 0      | —        | —        |
| TMB-4<br>(mg/kg)                   |  |        |          |          |
| 2.5                                |  | 100    | 50       | 0        |
| 5.0                                | 100  | 84     | 50       | —        |
| 50.0                               |  | 100    | 100      | 100      |

## DISKUSIJA

Navedeni eksperimenti pokazuju da TMB-4 posle intravenske injekcije srazmerno brzo iščezava iz krvi pacova. Slično je ranije utvrđeno i za pralidoksim (6, 5). U tom pogledu ova dva kvaternarna piridinijska oksima se razlikuju od diacetilmonoksima (DAM), koji se znatno sporije eliminiše iz organizma (3).

Jetra verovatno ne igra značajnu ulogu u inaktivaciji TMB-4, jer je perzistencija oksima u krvi hepatektomisanih životinja gotovo ista kao i kod normalnih životinja. U prilog takvom tvrđenju mogu se navesti i eksperimentalni podaci izneti u tabl. 2, koja pokazuje da oštećenje jetre izazvano tetrahlorugljenikom nema uticaja na akutnu toksičnost TMB-4. U istom smislu govore i ogledi u kojima je upotrebljen specifični metabolički inhibitor CFT 1201. *Maibauer, Neubert i Rottka* (7) pokazali su da ovo jedinjenje ima snažno inhibitorno dejstvo na enzimski sistem u mikrozomima jetre, koji učestvuje u biotransformaciji mnogih supstancija. Zanimljivo je, takođe, da i SKF 525 A (dietilaminoetil difenilpropilacetat), koji je takođe snažan inhibitor mikrozomnih enzima, nema uticaja na perzistenciju pralidoksima u krvi pacova (15).

Činjenica da jetra, a posebno njen mikrozomni enzimski sistem, ne igra verovatno značajnu ulogu u detoksikaciji TMB-4, ukazuje da je izrazito prolongiranje protektivnog dejstva ovog oksima posle aplikacije SKF 525 A i CFT 1201 (9) posledica drugih faktora, a ne inhibitornog dejstva ovih supstancija na aktivnost mikrozomnih enzima jetre. U tom pogledu zanimljiva su ispitivanja *Boveta* i *Bovet-Nitti* (1) koji su našli da SKF 525 A potencira dejstvo nekih kurarizantnih supstancija (na primer, sukcinilholina) u čijoj inaktivaciji mikrozomni enzimi sigurno nemaju udela.

Najveći deo ubrizganog TMB-4 izlučuje se verovatno preko bubrega. Važnost funkcije bubrega za eliminaciju ovog oksima proizilazi već na osnovu činjenice da je poluvreme oksima kod nefrektomisanih životinja znatno duže nego kod kontrolnih životinja. *Jager i saradnici* (6) su pokazali da je to slučaj i sa pralidoksimom, kako kod pacova, tako i kod čoveka. *Enander, Sundwall i Sörbo* (5) su našli, takođe, da se u mokraći pacova u toku 24 sata izluči 80 do 90% radioaktivno-markiranog pralidoksima i to najvećim delom (do 90%) u nepromenjenom obliku. Naši ogledi pokazuju da kod normalnih pacova tretiranih malim dozama TMB-4 (2.5–5.0 mg/kg i. p.) mokraća spontano izlučena u toku 30 do 60 minuta posle injekcije oksima ima izrazit (100%) zaštitni efekat kod miševa otrovanih sigurnom smrtnom dozom paraoksiona. To, nesumnjivo, pokazuje da se i ovaj oksim izlučuje u mokraći u aktivnom stanju i to vrlo brzo posle injekcije oksima.

Brza eliminacija oksima u mokraći je razlog što je protektivno dejstvo oksima srazmerno kratkotrajno, čak i kad se oni profilaktički aplikuju u dozama koje odgovaraju jednoj polovini LD<sub>50</sub> (9). Sa praktičkog gledišta primene oksima u terapiji trovanja organofosfornim antiholinesterazama, kratkotrajno dejstvo oksima predstavlja svakako značajan nedostatak, naročito kad su u pitanju inhibitori holinesteraze koji dugo perzistiraju u organizmu (14). Ne treba, međutim, zaboraviti da brzina eliminacije oksima kod normalnih životinja i čoveka, što je dosad jedino proučavano, ne mora biti ista i posle unošenja organofosfata. Naša ispitivanja, koja su u toku, pokazaće da li postoji bitna razlika u pogledu perzistencije oksima kod normalnih i otrovanih životinja.

#### ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivan je uticaj parcijalne hepatektomije, bilateralne nefrektomije i inhibitora mikrozoimnih enzima u jetri (CFT 1201) na brzinu iščezavanja TMB-4 iz krvi pacova. Na osnovu postignutih rezultata zaključeno je da se kod pacova najveći deo ubrizganog TMB-4 izlučuje preko bubrega u aktivnom obliku. Jetra nema značajnijeg udela u inaktivaciji ovog oksima.

\*

Zahvaljujemo Komisiji za medicinsko-naučno istraživanje koja je omogućila ovaj rad.

#### Literatura

1. *Bovet, i Bovet-Nitti, F.*, Farmakologija i toksikologija, 22, 201, 1959.
2. *Creasey, H. N. i Green, A. L.*, J. Pharm. Pharmacol., 11, 485, 1959.
3. *Dultz, L., Epstein, M. A., Freeman, G., Gray, E. H. i Weil, W. B.*, J. Pharmacol. exp. Therap., 119, 522, 1957.

4. Dost, F. H. i Weingärtner, L., Schw. med. Wschr., 82, 1310, 1952.
5. Enander, J., Sundwall, A. i Sörbo, B., Biochem. Pharmacol., 11, 377, 1962.
6. Jager, B. U., Stagg, G. N., Green, N. i Jager, L., Bull. Johns Hopkins Hosp., 102, 225, 1958.
7. Maibauer, D., Neubert, D. i Rotka, H., Arch. exp. Path. u. Pharmacol., 234, 474, 1958.
8. Miller, L. C. i Tainter, M. L., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 57, 261, 1944.
9. Milošević, M. P., Terzić, M. i Uojvodić, U., Arch. int. Pharmacodyn., 132, 180, 1961.
10. Milošević, M. P. i Terzić, M., Voj. San. Pregled, 19, 621, 1962.
11. Newman, E. U., Brodley, J. i Winternitz, J., Bull. J. Hopkins Hosp., 75, 253, 1943) (cit. prema Dost i Weingärtner-u).
12. Stevanović, M., Lično saopštenje.
13. Sundwall, A., Tidskrift i militär hälsovård, 4, 351, 1961 (engl. tekst).
14. Vandekar, M. i Heath, D. F., Biochem. J., 67, 202, 1957.
15. Wilhelm, K. i Vandekar, M., I Simpozij o antikolinesterazama, Zagreb, 1961.

#### Resumé

#### PERSISTANCE DE TMB-A DANS LE SANG DU RAT

Dans cette étude, a été examiné l'effet de l'hépatectomie partielle, de la néphrectomie bilatérale, ainsi que des inhibiteurs des enzymes microsomiaux du foie (CFT 1201) sur la cinétique d'élimination de l'oxime TMB<sub>4</sub> du sang de rat.

D'après les résultats obtenus, nous avons conclu que, chez cet animal, la plus grande partie de l'oxime injecté est excrétée par le rein sous forme biologiquement active et que le foie ne joue pas un rôle notable dans l'inactivation du TMB<sub>4</sub>.

*Institut de Pharmacologie,  
Faculté de Médecine, Belgrade*

*Reçu le 12 Juillet 1963*