

TOKSIKOLOGIJA ORGANOFOSFORNIH INSEKTICIDA

M. VANDEKAR

*Institut za medicinska istraživanja Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti,
Zagreb*

(Primljeno 20. IV. 1958)

Prikazana je biokemija, farmakologija, eksperimentalna i klinička toksikologija, terapija i prevencija otrovanja organofosforim insekticidima. Opširnije su iznijeta današnja shvaćanja o mehanizmu djelovanja organofosfornih inhibitora na kolinesterazu i istraživanja s područja reaktivacije inhibirane kolinesteraze pomoću nukleofilnih reagensa.

I. UVOD

Organofosforni insekticidi predstavljaju grupu otrova, kojih je značenje posljednjih nekoliko godina znatno poraslo zbog njihove sve šire primjene u poljoprivredi i javnom zdravstvu. Ti spojevi zauzimaju važno mjesto u modernoj zaštiti bilja, a neki, manje otrovni, postepeno se uvode za tamanjenje insekata, koji prenose bolesti, a koji su razvili rezistenciju na insekticide iz grupe kloriranih ugljikovodika. Neki organofosforni spojevi primjenjuju se kao terapeutici u humanoj i veterinarskoj medicini, a mnogi od tih spojeva služe kao vrlo korisno sredstvo pri proučavanju funkcije acetilkolina, kao i biokemijskih karakteristika enzima, koji razgrađuju acetilkolin u organizmu. Neki vrlo otrovni i hlapljivi spojevi te grupe su neobično jaki nervni otrovi.

Esteri fosforne kiseline poznati su već više od 100 godina, ali njihova insekticidna svojstva zapazili su tek 1935. godine *Schrader* i njegovi suradnici u laboratorijima tvornice Bayer u Njemačkoj (124). Od prvog komercijalnog preparata, tetractil-pirofosfata (TEPP) sintetiziran je do danas velik broj organofosfornih spojeva s insekticidnim djelovanjem i mnogi se od njih nalaze na tržištu pod različitim tvorničkim imenima. Danas je komercijalno najvažniji spoj dictil *p*-nitrofenil tiofosfat

(E605), koji je 1944. godine također sintetiziran u Bayerovim laboratorijima, ali su ga Amerikanci prvi počeli komercijalno proizvoditi pod imenom Parathion. Tablica 1. prikazuje strukturne formule i kemijska imena najvažnijih organofosfornih spojeva zajedno sa zaštićenim imenom preparata, pod kojim se spoj nalazi na tržištu. Na istoj tablici prikazani su i nervni otrovi iz grupe organofosfornih spojeva.

Organofosforni insekticidi prodiru brzo u organizam preko gastrointestinalnog trakta, pluća ili kroz kožu. Opće toksikološko djelovanje na sisavcima jednako je za sve biološki aktivne organofosforne spojeve. Nakon ulaska u organizam oni inhibiraju enzim kolinesterazu, koja ima zadaću da hidrolizira acetilkolin u organizmu. Gotovo svi simptomi otrovanja organofosfornim insekticidima mogu se pripisati hiperfunkciji kolinergičnog nervnog sistema, izazvanoj akumulacijom acetilkolina u nervnim sinapsama.

Među biološki aktivnim esterima fosforne kiseline razlikujemo dvije grupe spojeva: jedni reagiraju s kolinesterazom *in vitro* i *in vivo* (na pr. Paraoxon ili TEPP); drugu grupu čine spojevi, koji ne inhibiraju, ili vrlo slabo inhibiraju kolinesterazu *in vitro* (na pr. Parathion, Malathion ili Schradan), i tek se u organizmu stvara aktivni inhibitor kolinesteraze. Tako na pr. Parathion u organizmu životinje prelazi enzimatskom oksidacijom u Paraoxon (48). David i Aldridge (43) pokazali su nedavno, da slična reakcija nastaje pod određenim uvjetima i u biljnom organi-

Tablica 1

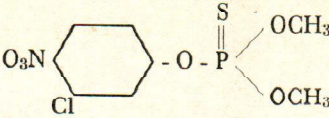
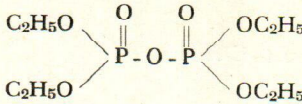
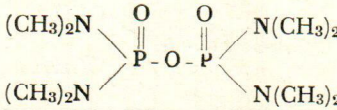
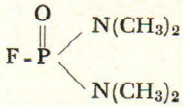
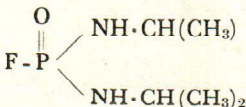
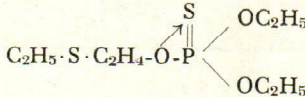
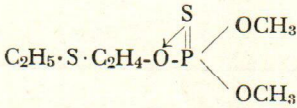
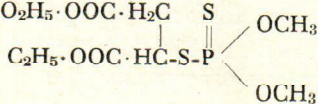
Pregled formula i komercijalnih imena nekih organofosfornih spojeva

Spoj	Formula	Komercijalno ime
<i>o,o</i> -Dietil- <i>o-p</i> -nitrofenil tiofosfat		Parathion, E605, E605 forte, Folidol, Thiophos 3422, Paration 20 »Pinus«, Duphar Parathion, Fosferno, Ekatox, Liro-tion
<i>o,o</i> -Dietil- <i>o-p</i> -nitrofenil fosfat		Paraoxon, E600, Mintacol
<i>o,o</i> -Dimetil- <i>o-p</i> -nitrofenil tiofosfat		Methyl-parathion, E605 Staub, Ekatox Staub

Spoj	Formula	Komercijalno ime
0,0-dietil 0-2-izopropil-4-metil-pirimidil (6) tiofosfat	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \searrow \\ \text{CH} - \text{C} \begin{array}{l} \text{N} = \text{C} \cdot \text{CH}_2 \\ \text{N} \end{array} \\ \text{CH}_3 \nearrow \end{array} \begin{array}{c} \text{CH} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{O} - \text{P} \begin{array}{l} \text{S} \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \end{array} \end{array} $	Diazinon, G 24480, Basudin
0,0-Dimetil 2,2,2-trikloro-1-hidroksietil fosfonat	$ \text{Cl}_3\text{-C-HOHC-P} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCH}_3 \\ \text{OCH}_3 \end{array} $	Dipterex, Bayer L 13/59
Dimetil 2,2-diklorovinil fosfat	$ \text{Cl}_2\text{C=HC-O-P} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCH}_3 \\ \text{OCH}_3 \end{array} $	DDVP
Diizopropil fluoro-fosfonat	$ \text{F-P} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCH}(\text{CH}_3)_2 \\ \text{OCH}(\text{CH}_3)_2 \end{array} $	DFP
Izopropoksimetil fosforil fluorid	$ \text{F-P} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCH}(\text{CH}_3)_2 \\ \text{CH}_3 \end{array} $	Sarin (nervni otrov)
Dimetilamido-etoksi-fosforil cijanid	$ \text{NC-P} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \text{N}(\text{CH}_3)_2 \end{array} $	Tabun (nervni otrov)
Pinakoloksimetil fosforil fluorid	$ \text{F-P} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \\ \text{O} \cdot \text{CH} \cdot \text{C} \begin{array}{l} (\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \end{array} $	Soman (nervni otrov)

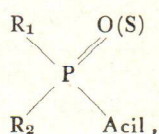
zmu. Određivanjem miotične aktivnosti (122) može se ocijeniti direktna inhibitorna aktivnost organofosfornog spoja i *in vivo*.

Schrader (125) smatra, da su biološki aktivni oni esteri fosforne kiseline, koji zadovoljavaju ove osnovne uvjete:

Spoj	Formula	Komercijalno ime
<i>o,o</i> -Dimetil- <i>o</i> -(3-kloro-4-nitrofenil) tiofosfat		Chlorthion, Bayer 22/190
Tetraetilpirofosfat		TEPP
Oktametilpirofosforamid		Schradan OMPA, Pestox III
Bis (dimetilamino)-fluoro fosfin oksid		Dimefox
Bis (monoizopropilamino)-fluorofosfin oksid		Mipafox, Isopestox
<i>o,o</i> -Dietil- <i>o</i> -etiltioetil fosforotionat i <i>o,o</i> -dietil <i>S</i> -etiltioetil fosforotiolat		Systox, Demeton, E 1059
<i>o,o</i> -Dimetil <i>o</i> -etiltioetil fosforotionat i <i>o,o</i> -dimetil <i>S</i> -etiltioetil fosforotiolat		Metasystox, Methyl- demeton
<i>o,o</i> -Dimetil <i>S</i> -(1,2-dikarbetoksietil) ditiofosfat		Malathion, Malathon, »4049« Etiol

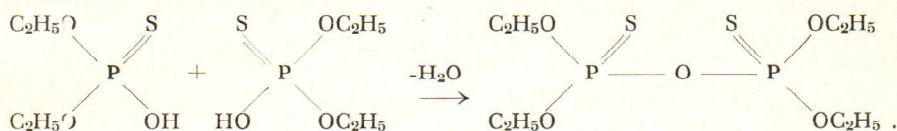
1. sadržavaju 5-valentni fosfor kao centralni atom;
2. na centralni atom fosfora vezan je dvostrukom vezom kisik ili sumpor;
3. na centralni fosfori atom vezana su pored toga dva neutralna ostatka (alkil ili alkoksil);
4. na petu valenciju fosfora vezan je acilni ostatak (fluor, CN, SCN i t. d.).

Prema tome može se konstitucija biološki aktivnih organofosfornih estera prikazati ovako:



gdje R_1 i R_2 predstavljaju alkilne ili alkosilne grupe ili ostatke primarnih ili sekundarnih baza. *Schraderov* se princip pokazao vrlo korisnim pri sintezi novih spojeva.

Ako, na pr., na jednu molekulu dietil-tiofosforne kiseline vežemo drugu molekulu dietil-tiofosforne kiseline kao acilni ostatak, dobit ćemo ester pirofosforne kiseline ove konstitucije:



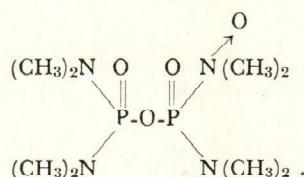
Ta je supstancija sintetizirana 1944. godine u Bayerovim laboratorijima i nalazi se u prometu pod imenom Bladafum, kao sredstvo za fumigaciju staklenika.

Analognom pirokondenzacijom dietil-fosforne kiseline dobivamo već spomenuti tetraetil-pirofosfat (TEPP), koji je sintetiziran još 1850. godine, ali su njegova toksična svojstva istražena tek 1938. godine (124).

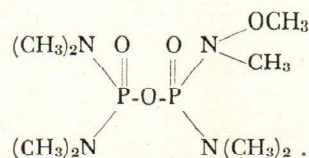
Princip naprijed navedene sheme može se primijeniti i na spojeve, koji kao supstituenti R_1 i R_2 imaju dimetil-amino grupe, kao što je na pr. Dimefox. Ta supstancija, sintetizirana u Bayerovim laboratorijima u Elberfeldu, ima karakter t. zv. sistemskih insekticida, koji se rasprostranjuju po čitavom organizmu biljke i štite je od insekata, koji sišu. U Engleskoj se Dimefox upotrebljava kao sredstvo za zaštitu bilja, i pomoću posebnih uređaja ulijeva se u tlo, otkud ga biljke uzimaju. Taj spoj je vrlo jak otrov za sisavce, i zbog toga je njegova upotreba kao sredstva za zaštitu bilja bila neko vrijeme zabranjena. Danas se u

Engleskoj prodaje i pod imenom Hanane. Dimefox je slabi inhibitor kolinesteraze *in vitro*; *in vivo*, međutim, prelazi djelovanjem jetre u vrlo jak ali nestabilan inhibitor kolinesteraze (58).

Kondenzacijom dviju molekula bis-dimetil-aminofosforne kiseline dobiva se spoj, koji je poznat pod imenom Schradan ili OMPA. To je amid aktametil-pirofosforne kiseline. Sintetizirao ga je *Schrader* 1941. godine, a *Kilby*, koji je proučavao biokemijska svojstva tog spoja (91), nazvao ga je u čast njegova pronalazača Schradan. Schradan nema gotovo nikakvu inhibitornu moć *in vitro*, dok je naprotiv, *in vivo* vrlo jak inhibitor kolinesteraze. Inhibitorna sposobnost Schradana *in vitro* znatno se povećava, ako ga pomiješamo sa štakorskim jetrima (47, 65, 112, 113). *Harley* (74) je našao, da Schradan s permanganatom stvara labilni spoj, koji je međutim vrlo jak inhibitor kolinesteraze *in vitro*. Smatra se, da taj spoj ima ovu konstituciju (39):



Taj amin-oksidi inhibira osim kolinesteraze i druge enzime. Preko tog spoja može se doći i do stabilnog, ali manje aktivnog metiliranog hidroksilaminskog spoja (125):

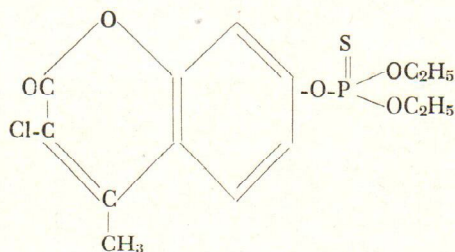


I Schradan pripada grupi sistemskih insekticida.

Općenito možemo sistemske insekticide klasificirati u tri grupe (119). Prva grupa obuhvaća insekticide, koji su stabilni kroz čitavo vrijeme postojanja u biljci i biljka ih ne razgrađuje. Tipičan primjer za tu grupu je selen. Drugu grupu sačinjavaju t. zv. endolitski insekticidi, koji se nalaze u biljci u svom originalnom obliku, sve dok ih organizam biljke ne razori. Primjeri za tu grupu, među mnogim drugima, su Schradan i Dimefox. Treću grupu čine t. zv. endometatoksični insekticidi, koji u organizmu biljke prelaze u druge toksične produkte s insekticidnim svojstvima. Primjeri za tu posljednju grupu su Systox (63, 76) i Metasystox (107). Sistemske otrove nalazimo i u prirodi, na pr. natrijev fluoroacetat, koji se nalazi u južnoafričkoj biljci Gif Blaar.

Širu primjenu organofosfornih spojeva u poljoprivredi, a napose u javnom zdravstvu, sprečava velika toksičnost tih spojeva. Zbog toga se nastoji sintetizirati nove spojeve, koji bi imali ista ili bolja insekticidna svojstva, ali manju toksičnost za toplokrvne životinje. Primjer za takav spoj je Diazinon, koji je sintetizirala švicarska tvornica Geigy. Diazinon se dobiva uvođenjem dietil-tionofosforilnog ostatka u 2-izopropil-4-metil-6-oksipirimidin. I Amerikanci su uspjeli sintetizirati jedan fosforini ester, koji ima malu toksičnost za sisavce. To je Malathion, i upotrebljava se kao kontaktni insekticid za suzbijanje muha, koje su rezistentne na DDT. Paralelno sa smanjenom toksičnošću za toplokrvne životinje smanjuje se međutim i otrovnost za insekte, pa se te supstancije moraju upotrebiti u razmjerno većim količinama. Premda Parathion zbog velike toksičnosti za sisavce nije idealno insekticidno sredstvo, taj se spoj od svih najviše upotrebljava, i to kao polivalentni kontaktni insekticid u poljoprivredi i šumarstvu.

U posljednje vrijeme pokušalo se ukloniti još jedan nedostatak organofosfornih spojeva. Ti spojevi, naime, nisu stabilni i prema tome nemaju rezidualno djelovanje, koje je karakteristično za DDT ili slične insekticide iz reda kloriranih ugljikovodika. Čini se, da je u novije vrijeme i u tom pravcu učinjen napredak sintezom Resitoxa:



Resitox ima rezidualno djelovanje, i on je u tome izuzetak među organofosfornim spojevima (125).

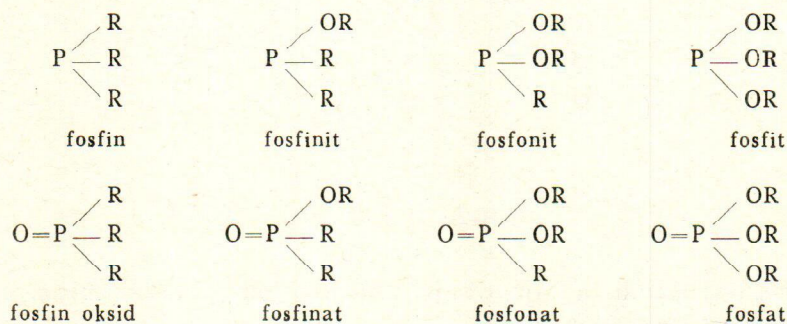
Novi smjer u sintezi predstavlja Bayerov preparat Dipterex: 0,0-dimetil-2,2,2-triklor-1, oksietil-fosfat, koji je topljiv u vodi, kloroformu i benzenu. Konstitucija tog spoja ne slaže se s općom shemom, koju je dao Schrader, ali u slabo alkalnom mediju on prelazi u dimetil-diklorovinil-ester fosforne kiseline (DDVP) (102). Taj je spoj hlapljiv, a to također pridonosi njegovu toksičnom djelovanju protiv muha.

Tablica 2. sadržava neke fizičke karakteristike pojedinih organofosfornih spojeva, a na sl. 1 prikazana je nomenklatura za neke organofosforne spojeve (94).

Tablica 2

Fizičke karakteristike nekih organofosfornih spojeva

Naziv	Agregatno stanje	Vrelište
Parathion T. E. P. P. Paraoxon	žuta uljasta tekućina bezbojna tekućina crvenkasto-žuta uljasta tekućina	157-162°C pri 0.6 mm Hg 104-110°C pri 0,08 mm Hg 148-151°C pri 1 mm Hg
Systox (Demeton)	bezbojna uljasta tekućina	134°C pri 2 mm Hg
Malathion	žućkasta uljasta tekućina	156-157°C pri 0.7 mm Hg
Diazinon	bezbojna uljasta tekućina	83-84°C pri 0.002 mg Hg
Sulfotepp	slabo žućkasta uljasta tekućina	110-113°C pri 0.2 mm Hg
Schradan	bezbojna uljasta tekućina	118-122°C pri 0.3 mm Hg
Metil parathion Sarin	bijela kristalizirana krutina bezbojna tekućina	147°C pri 12 mm Hg tlak para pri 20°C 1.57 mm Hg
Tabun	bezbojna do smeđa tekućina	237°C pri N. T. 108°C pri 12 mm Hg tlak para pri 25°C 0.070 mm
Soman	bezbojna tekućina	42°C pri 0.2 mm Hg tlak para na 20°C 0.207 mm



Sl. 1. Nomenklatura za neke organofosforne spojeve (94)

U stranoj literaturi postoje monografije i skupni prikazi, koji obrađuju organofosforne spojeve s kemijskog (124), biokemijskog (6, 108), farmakološkog (95), kliničkog (66, 116, 128) i higijensko-zaštitnog (21, 22, 50) aspekta. Posljednje tri citirane radnje sadržavaju opsežnu bibliografiju s područja organofosfornih insekticida i s područja ostalih pesticida.

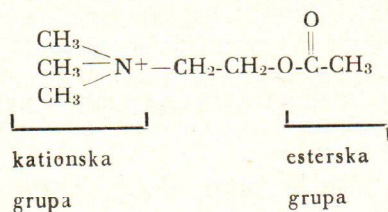
2. BIOKEMIJA

U organizmu postoje dvije kolinesteraze, t. zv. specifična (ili prava) kolinesteraza i nespecifična (ili pseudo-) kolinesteraza. Specifična se kolinesteraza nalazi u mozgu i perifernom nervnom sistemu i njezina je fiziološka funkcija da razgrađuje acetilkolin, koji se oslobađa prilikom dolaska nervnog impulsa. Zbog njezina izrazitog afiniteta prema acetilkolinu naziva se i acetilkolinesteraza. I eritrociti sadržavaju u svojoj stromi specifičnu kolinesterazu, ali njezina fiziološka funkcija nije poznata.

Nespecifična (ili pseudo-) kolinesteraza nalazi se u gotovo svim tkivima, a naročito je mnogo ima u serumu čovjeka i nekih sisavaca. Zbog toga se naziva i serumska, odnosno tkivna kolinesteraza. Fiziološka funkcija pseudo-kolinesteraze nije poznata. O biokemijskim karakteristikama tih dviju grupa kolinesteraza raspravlja se u zasebnom prikazu (117).

Za biokemijska istraživanja specifične (prave) kolinesteraze obično se uzimaju prani eritrociti ovna ili čovjeka, mozak štakora ili kolinesteraza pripremljena iz električnog organa jegulje; kao izvor nespecifične (pseudo-) kolinesteraze služi najčešće čovječji ili konjski serum.

Acetilkolin je fiziološki supstrat specifične kolinesteraze. On ima dva karakteristična dijela, t. zv. kationsku i estersku grupu:



Niz eksperimentalnih podataka, koji se odnose na afinitet acetilkolinesteraze prema različitim supstratima, pokazuje, da acetilkolinesteraza u svom aktivnom centru ima anionsku i estersku stranu, na koje pristaje acetilkolin pri procesu hidrolize (110, 138) (vidi sliku 2a).

Ta je teorija od značenja ne samo pri tumačenju mehanizma hidrolize supstrata, već i za razumijevanje inhibicije specifične kolinesteraze određenim inhibitorima, kao i reaktivacije inhibiranog enzima pomoću reaktivatora, o čemu će biti govora u ovom poglavlju.

2.1 Inhibicija kolinesteraze

Pri razmatranju načina, na koji se zbiva proces inhibicije, treba imati na umu, da organofosforni spojevi inhibiraju ne samo obje kolinesteraze (specifičnu i nespecifičnu), već inhibiraju i druge enzime, koji hidroliziraju

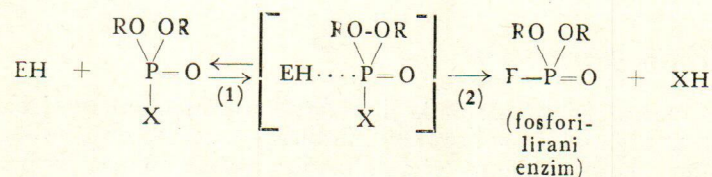
ziraju karboksilne estere (5). A-esteraza je izuzetak, i premda hidrolizira karboksilne estere (na pr. fenilacetat), organofosforni spojevi je ne inhibiraju (2).

Iz radova *Jansena* i suradnika (86), koji su upotrebili kristalizirani kimotripsin, znamo, da se prilikom inhibicije s DFP-om vežu na kimotripsin 1 atom fosfora i 2 izopropilne grupe. U toku inhibitorynog procesa oslobađa se ujedno 1 molekula kiseline. Rekristalizirani inhibirani enzim nije sadržavao fluor. Drugim riječima, enzim je bio di-izopropilfosforiliran. Analogni rezultati dobiveni su kasnije s TEPP-om i s E600 na kristaliziranom kimotripsinu i kristaliziranom tripsinu (19, 73, 92). Atom fosfora čvrsto se vezao na molekulu enzima, i brzina reakcije inhibitora s enzimom uvijek je pokazivala karakteristike bimolekularne reakcije.

2.1.1 Dokazi za fosforiliranje kolinesteraze

Budući da kemijski čista kolinesteraza još nije izolirana, za istraživanje mehanizma inhibicije upotrebljene su indirektno metode. Pokusi s DFP-om, koji je sadržavao radioaktivni fosfor, pokazali su, da inhibirana kolinesteraza sadržava fosfor, koji je veoma čvrsto vezan na enzim i ne može se ukloniti ni prolongiranjem dijalizom, ni djelovanjem trikloroctene kiseline (32, 87, 105, 106). Inhibicija je progresivna i kompetitivna. Prisutnost određene koncentracije supstrata lagano sprečava inhibiciju (1, 35, 41, 79), ali dodavanjem supstrata već inhibiranom enzim kolinesteraza se ne reaktivira. Prema tome, organofosforni inhibitori reagiraju s aktivnim centrom enzima ili blizu njega i fosfor je čvrsto vezan na to mjesto.

Proces adsorpcije teško bi mogao doći u obzir za tako čvrstu vezu između inhibitora i enzima, i *Aldridge* (4) je, na temelju kinetskih proučavanja utjecaja temperature na brzinu inhibicije, isključio tu mogućnost. Kinetika reakcije eritrocitne kolinesteraze s organofosforinim inhibitorima pokazuje karakteristike bimolekularne reakcije s jednom komponentom (inhibitorom) u velikom suvišku. *Aldridgeovi* pokusi su pokazali, da energija aktivacije za pravu kolinesterazu i E600 iznosi 10–11 kcal/mol. Iz toga on zaključuje, da je prilikom inhibicije došlo do dublje kemijske promjene, t. j. fosforiliranja enzima. Evo kako teče proces inhibicije prema *Aldridgeu* (5):



Jandorf i suradnici (85) su pokazali, da se pri reakciji kimotripsina s DFP-om, TEPP-om i Sarinom, iako se one zbivaju različitim brzinama, oslobađaju 1 mol kiseline na 1 mol proteina i adiraju 1 mol fosfora i 2 mola alkoksilnih grupa na 1 mol proteina, uz uvjet, da ta reakcija teče do potpune inaktivacije enzima. Autori su došli do analognih zaključaka s kolinesterazom, određivši količinu vezanog P^{32} u kompletno inhibiranoj kolinesterazi s DFP-om.

Prema tome reakcija između kolinesteraze i inhibitora u suvišku odvijaju se poput bimolekularnih reakcija prvog reda (pseudo-unimolekularna reakcija). *Jandorf* i suradnici (85) daju ove konstante brzina tih reakcija (Tablica 3.):

Tablica 3

Bimolekularna konstanta za brzinu reakcije između esteraza i inhibitora (85)
(rezultati izraženi kao $l \cdot mol^{-1} \cdot min^{-1}$)

<i>Enzim</i>	<i>DFP</i>	<i>TEPP</i>	<i>Sarin</i>
kolinesteraza električnog organa jeguļe	$1,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$
kolinesteraza ljudskih eritrocita	$9,5 \times 10^4$	$2,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$
kolinesteraza konjskog seruma	$1,5 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$4,4 \times 10^8$
kimotripsin	$2,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^4$
tripsin	$8,3 \times 10^2$	$9,7 \times 10^4$	$1,2 \times 10^8$

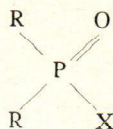
Inhibitorna moć nekog spoja obično se mjeri na taj način, da se odredi t. zv. I_{50} , t. j. koncentracija dotičnog spoja (izražena u molovima), koja smanjuje aktivnost enzima za 50%. I_{50} zavisi od vrste inhibitora, enzima, vrijednosti pH i temperature. Iz prije izloženog proizlazi, da bi, pod idealnim uvjetima, koncentracija organofosfornog inhibitora, koja proizvodi 50% inhibiciju (I_{50}), trebala biti upravo polovina koncentracije enzima, i da je svaka devijacija od ovog odnosa uzrokovana submaksimalnom inhibicijom ili simultanim reakcijama, kao što je, na primjer, hidroliza inhibitora (85). Zbog toga je, za isporođivanje inhibitorne moći različitih organofosfornih inhibitora, potrebno odrediti njihovu I_{50} ne samo na jednakom preparatu kolinesteraze pri istom pH i istoj temperaturi, već koncentracija enzima treba da bude približno jednaka, a vrijeme inkubacije enzima s inhibitorom (prije dodavanja supstrata) mora biti isto.

2.1.2 Faktori od kojih zavisi inhibitorna moć organofosfornog spoja

Aktivnost bilo kojeg organofosfornog spoja zavisi od strukture spoja, kao i od karakteristika enzima. U uvodu smo naveli, koje osnovne karakteristike treba da ima organofosforni spoj, da bude biološki aktivan.

Spomenuta je i podjela organofosforinih estera u »direktne« i »indirektne« inhibitore, od kojih posljednji imaju slabu ili nikakvu inhibitornu moć i tek metabolizmom u organizmu biljaka ili životinja prelaze u aktivni inhibitor kolinesteraze.

Aldridge i Davison (8) su za niz analoga Paraoxona (E600) pokazali, da su ti organofosforini spojevi to jači inhibitori, što se lakše hidroliziraju. Istraženih deset spojeva pripadali su grupi usko srodnih spojeva s jednakim alkilnim grupama (R), dok su u aromatski prsten (X)



uvедene grupe, koje imaju svojstvo da privlače elektrone. Time je fosfor postao elektrofilniji i izloženiji djelovanju OH⁻ iona. *Nachmansohn* i *Wilson* su istakli važnost elektrofilne prirode fosfora za inhibitorna svojstva tih spojeva (110).

Znamo, da postoje znatne razlike između prave i pseudokolinesteraze s obzirom na njihovu aktivnost prema različitim supstratima (15). Polazeći sa stajališta, da se organofosforini inhibitor može smatrati u stvari također supstratom kolinesteraze (vidi kasnije), *Aldridge* (5) je odredio aktivnost prave i pseudokolinesteraze prema određenom nizu kolinskih estera. Podijelivši aktivnost pseudokolinesteraze s aktivnošću prave kolinesteraze dobio je t. zv. supstratni omjer. Isto tako je odredio aktivnost određenog niza organofosforinih inhibitora (*p*-nitrofenil fosfata i fluorofosfin-oksida) prema pravoj i pseudo-kolinesterazi i na analogan je način odredio t. zv. inhibitorni omjer. Zatim je direktno isporučio ta dva omjera smatrajući, da fosfor iz molekule inhibitora odgovara mjestu, koje zauzima acilni ugljik kolinskog estera. Na taj način mogu se komparirati inhibitori i supstrati s obzirom na duljinu i strukturu lanaca (R) vezanih na ta dva atoma. *Aldridge* je našao, da porast supstratnog omjera odgovara za istražene inhibitore porastu inhibitornog omjera. To je ujedno dalji dokaz, da se pri hidrolizi kolinskih estera i inhibiciji organofosforinih spojevima odvijaju slični procesi (vidi kasnije). Zavisnost o duljini i strukturi lanaca (R) i inhibitorne moći jest faktor, koji možemo nazvati – kao što ga enzimolozi obično nazivaju – »pristajanje« (»fit«). To pristajanje sadržano je u navedenim omjerima, koji su u stvari mjera afiniteta (»fitting power«).

U prije spomenutim pokusima, koje su izvršili *Aldridge i Davison* (8), istaknuta je hidrolitička nestabilnost inhibitora, odnosno elektrofilnost fosfora, kao važan faktor aktivnosti inhibitora. Dietil-fosfatna grupa (t. j. dio koji pristaje) bila je kod tih pokusa uvijek ista, a mijenjanjem supstituenata u aromatičnom prstenu mijenjala se stabilnost u širokom rasponu. Promijene li se alkilne grupe (R), mijenja se oboje – i

stabilnost i pristajanje (5). Jaki afinitet, što ga ima Sarin za kolinesterazu, može se dobrim dijelom pripisati njegovoj metil-fosfilnoj grupi (85).

Osim ta dva faktora, vezana uz afinitet inhibitora prema esterskoj strani aktivnog centra enzima, postoji i faktor, koji djeluje na anionskoj strani. *Heath* i *Vandekar* (77) sintetizirali su sulfonio derivate tiolskih izomera *Systoxa* i *Metasystoxa*. Pri isporođivanju intravenozne toksičnosti na štakorima opaženo je, da su sulfonio derivati oko 1000 puta toksičniji od odnosnih tiolskih izomera. Isto tako je nađena vrlo jaka aktivnost obaju derivata *in vitro* (Tablica 4.)

Tablica 4

Razlike u inhibitorskoj moći i intravenoznoj toksičnosti tiolskog izomera *Metasystoxa* i njegovog sulfonio derivata (77)

spoj	i. v. LD ₅₀ (mg/kg)	I ₅₀ (M)
$\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \text{S} \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{S} - \text{P} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCH}_3 \\ \text{OCH}_3 \end{array}$ (tiolski izomer <i>Metasystoxa</i>)	64.6	6.5×10^{-5}
$\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \overset{\text{CH}_3}{\underset{+}{\text{S}}} \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{S} - \text{P} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCH}_3 \\ \text{OCH}_3 \end{array}$ (sulfonio derivat tiolskog izomera <i>Metasystoxa</i>)	0.062	3.9×10^{-8}

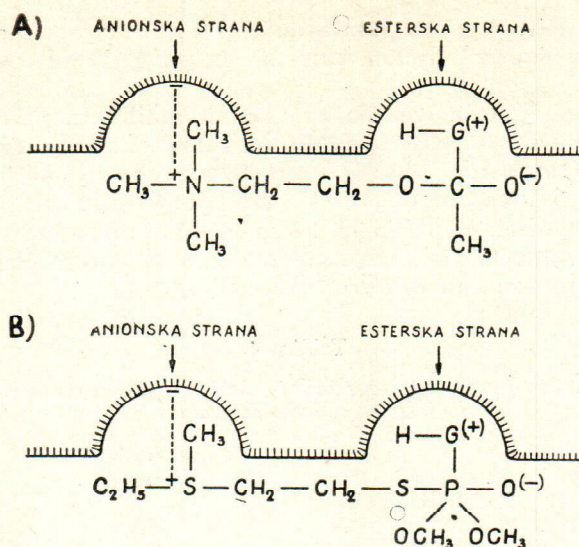
Prikažemo li prostorno vezanje inhibitora na kolinesterazu na način, kojim su *Nachmansohn* i *Wilson* (110) prikazali pristajanje supstrata – acetilkolina – na anionsku i kationsku stranu aktivnog centra (slika 2), lako ćemo uočiti, od kojeg je značenja pozitivan naboj sulfonio derivata, budući da se on nalazi upravo na mjestu, koje prostorno odgovara kvaterniziranom dušikovom atomu acetilkolina.

Prema tome, inhibitorna moć nekog organofosfornog spoja zavisi od ova tri glavna faktora:

(1) od acilne grupe (X). Uz iste R-ove mijenja se stabilnost spoja i elektrofilnost fosfora, ako se promijeni X; spojevi, koji brže hidroliziraju, jači su inhibitori.

(2) od alkilnih grupa (R). Uz isti X mijenja se aktivnost inhibitora, ako se promijeni »dio koji pristaje«.

(3) Dok prva dva faktora utječu na afinitet prema esterskoj strani, pozitivni naboj na X grupi pridonijet će aktivnosti – nalazi li se u pravoj udaljenosti od fosfora – zbog afiniteta prema anionskoj strani aktivnog centra enzima.



Sl. 2. Prostorno vezanje (A) acetilkolina (110) i (B) sulfonio derivata tiolskog izomera *Metasystoxa* na kolinesterazu

2.1.3 Svojstva inhibiranog enzima

Promotrimo li proces inhibicije prikazan u poglavlju 2.1.1, možemo na temelju jednostavnih kemijskih razmatranja očekivati, da se i fosforilirani enzim mora hidrolizirati određenom brzinom, koja se može mjeriti. *Wilson* (136) i *Hobbiger* (78) su pokazali, da se nakon inhibicije prave kolinesteraze s TEPP-om *in vitro* aktivnost enzima polagano vraća. *Aldridge* (4) je pokazao, da se aktivnost enzima vraća relativno brzo, ako se upotrebi dimetil *p*-nitrofenilfosfat (Me-E600) kao inhibitor. Iz temperaturnog koeficijenta *Aldridge* je izračunao energiju aktivacije. Ona je iznosila 14–15 kcal/mol, što se slaže s visokom vrijednošću, koja je nađena za stvaranje fosforiliranog enzima (isporedi 2.1.1).

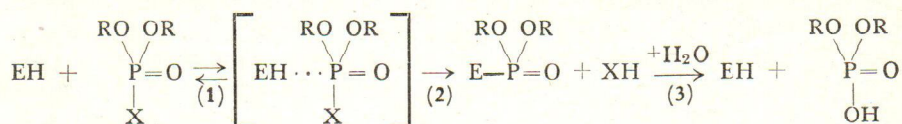
Aldridge i *Davison* (9) su upotrebili 4 dimetilna fosfata (dimetil *p*-nitrofenil fosfat, dimetil fosforofluoridat, tetrametil pirofosfat i 0,0-dimetil *S-p*-nitrofenil fosfortiolat) i našli, da je vraćanje aktivnosti inhibirane kolinesteraze bilo jednako za sva 4 inhibitora. Prema tome, u sva 4 slučaja stvorio se jednaki inhibirani enzim. Jedna od karakteristika procesa inhibicije jest, da će rezultirati jednaki inhibirani enzim bez obzira koja je grupa prisutna na mjestu »X«, ako su druge dvije (alkilne) grupe identične.

Na temelju jednostavnih kemijskih razmatranja proizlazi, da stabilnost fosforiliranog enzima zavisi (1) od alkilnih grupa vezanih na fosfor i (2) od samog enzima. Polovično vrijeme reaktivacije dimetilfosfo-

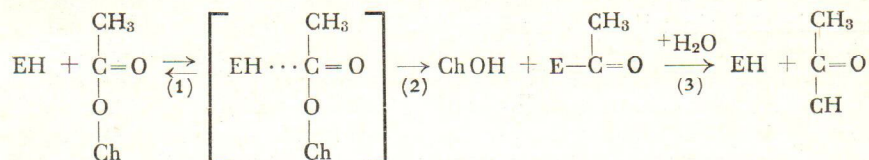
rilirane kolinesteraze eritrocita kunića iznosi oko 90 minuta pri 37° C i pH 7.6 (4). Za dietilfosforilirani enzim reaktivacija je mnogo sporija, a kod diizopropilfosforilirane kolinesteraze reaktivacija je izrazito spora. Davison (46) je proširio tu koncepciju na pseudokolinesterazu, proučavajući reaktivaciju dietilfosforilirane kolinesteraze štakora.

2.1.4 Proces inhibicije i reaktivacije

Na temelju naprijed navedenih eksperimenata Aldridge (5) je upotunio svoju shemu za inhibiciju i reaktivaciju kolinesteraze:



Kao što se vidi, u ovom je procesu inhibitor na kraju reakcije hidroliziran, a to se, kako znamo, dešava i kad kolinesterazi dodamo njezin supstrat – acetilkolin. Prema tome mogli bismo i organofosforni inhibitor ustvari smatrati supstratom kolinesteraze. Ako sada s gornjom shemom ispedimo *Nachmansohn-Wilsonovu* shemu (110) za hidrolizu acetilkolina vidimo, da one ustvari predstavljaju u suštini isti proces.



Pri hidrolizi acetilkolina formiranje acetiliranog enzima – preko reakcija (1) i (2) – je najsporija reakcija i ona određuje ukupnu brzinu reakcije. Reakcija (3), t. j. hidroliza acetiliranog enzima je veoma brza. Kod inhibitora je obrnuto. Stvaranje fosforiliranog enzima relativno je brzo, a njegova hidroliza preko reakcija (3) je veoma spora i ograničuje brzinu reakcije. Kad bi reakcija (3) bila brža od reakcije (1) i (2), kolinesteraza ne bi bila inhibirana, već bi se organofosforni spoj brzo hidrolizirao. Doista, postoji esteraza (A-esteraza), koja vrlo brzo hidrolizira organofosforni spoj E600 (2).

Prema tome se čini, da kolinesteraza napada organofosforne spojeve – budući da su esteri – i kao takve ih hidrolizira. Razlika je samo u brzini, kojom teče sama reakcija (3). Iz daljeg izlaganja vidjet ćemo, da takvo razmatranje vrijedi samo u slučaju kad nije došlo do t. zv. transfosforilacije u inhibiranom enzimu, koja dovodi enzim u stanje trajne – ireverzibilne – inhibicije.

2.1.5 Transfosforilacija

Prije je bilo izneseno, da organofosforni spojevi fosforiliraju kolinesterazu u toku procesa inhibicije. Budući da kolinesteraza ne posjeduje prostetičnu grupu, ta se reakcija mora zbivati vezanjem inhibitora na jednu aminokiselinu, ili grupu aminokiselina, na površini enzima.

Dopustimo li, da DFP ili Sarin potpuno inhibiraju kimotripsin, tripsin ili kolinesterazu, a inhibirani enzim zatim podvrgnemo hidrolizi pomoću kiseline, ili enzimatskoj hidrolizi, mogu se izolirati različiti peptidi, koji sadržavaju fosfor. Pri daljoj hidrolizi pokazalo se, da je fosfor uvijek vezan na hidroksilnu grupu serina, kao serin-fosfat ili serin-metilfosfonat (114, 123). *Jandorf* i suradnici (85) smatraju, međutim, da taj nalaz postavlja više problema nego ih rješava. Prvo, od 27 serinskih ostataka u kimotripsinogenu svega se jedan nalazi u takvom položaju, da bi mogao biti fosforiliran u toku procesa inhibicije. (Sadržaj serina u kolinesterazi je nepoznat.) Drugo, ni serin ni njegovi esteri, a ni peptidi, kod kojih je naden fosfor nakon inhibicije, ne reagiraju s DFP-om (132), i jedine kiseline, koje spremno stupaju u reakciju s DFP-om, su histidin (133) i tirozin (10). Mnogi autori smatraju, da serin nije prvo mjesto, na koje se veže dialkil-fosfatni ostatak pri inhibiciji enzima, već da je to histidin.

Fotokemijska oksidacija kimotripsina u prisustvu metilenskog plavila (135) dovodi do gubitka jedne molekule histidina (od ukupno dvije) i do gubitka od otprilike 3 do 7 ostataka triptofana (85). Takav foto-oksidirani kimotripsin nije više reagirao s DFP-om. Diizopropilfosforilirani kimotripsin, s druge strane, teže se foto-oksidirao (85). Iz odnosa aktivnosti kolinesteraze prema pH, *Wilson* i *Bergmann* (140) pretpostavljaju, da je glioksalni prsten histidina ono mjesto na enzimu, koje biva acilirano (pri reakciji kolinesteraze sa supstratom), odnosno fosforilirano (pri reagiranju enzima s organofosfornim inhibitorom). Histidin katalizira hidrolizu DFP-a, i pokazalo se, da je diizopropilfosforo-glioksalin veoma nestabilan (133).

Naprijed opisani pokusi, kao i eksperimenti s reaktivatorima (vidi kasnije), pokazuju, da se kod inhibirane kolinesteraze zbiva t. zv. transfosforilacija, t. j. dialkilni ostatak inhibitora seli se s jednog mjesta na enzim – odakle se može reaktivatorom ukloniti – na drugo mjesto – odakle se više ne može ukloniti ni najjačim reaktivatorom. Mnogi se autori priklanjaju *Wilsonovoj* i *Bergmannovoj* pretpostavci (140), da je prva grupa, na koju se veže inhibitor, imidazolska grupa histidina i dok je inhibitor vezan na tom mjestu, može se pomoću oksima ili drugih nukleofilnih reagensa reaktivirati. Kod produženog kontakta između enzima i inhibitora nastaje drugi stadij inhibicije, pri kojemu se inaktivirana kolinesteraza ne može više reaktivirati nikakvim reaktivatorima. Ta se pojava tumači selenjem (transfosforilacija) inhibitorova ostatka s imidazolske grupe histidina na serin. *Hobbiger* (80, 81) naziva ta dva stadija inhibicije »fosforilirani enzim I« i »fosforilirani enzim II«.

Wilson (139) je opisao izostanak reaktivacije pomoću nukleofilnih reagensa nakon pohranjivanja inhibirane kolinesteraze pri 25° C pri pH 7.0. Jandorf i suradnici (85) su u pokusima reaktivacije kolinesteraze električnog organa jegulje *Electrophorus electricus*, inhibirane DFP-om, našli zavisnost reaktivacije (pomoću pikolin-hidroksamske kiseline) od vremena inkubiranja enzima s inhibitorom. Do sličnih rezultata došli su i drugi autori (45, 80, 81). Brzina transfosforilacije, t. j. prelaženja inhibirane kolinesteraze iz reverzibilnog u ireverzibilni oblik, zavisi od tipa fosforiliranog enzima. Ona je najbrža kod diizopropilfosforiliranog enzima, relativno brza kod dimetilfosforiliranog enzima, a relativno spora kod dietilfosforiliranog enzima.

Jednaka se promjena zbiva na inhibiranom enzimu *in vivo*. Hobbiger (81) je našao kod bolesnika, koji je bolovao od Myasthenia gravis i primao TEPP kroz dulje vrijeme, da je gotovo sva kolinesteraza eritrocita inhibirana, i to u drugom ireverzibilnom stadiju. U pokusima s tiolskim izomerom Metasystoxa i njegovim derivatima (129) pokazalo se, da trajni ireverzibilni stadij inhibicije nastaje nakon jednokratne intravenozne injekcije tih inhibitora, kao posljedica duge persistencije inhibitora u organizmu. Slično se može proizvesti drugi, ireverzibilni stadij inhibicije prolongiranjem infuzijom nepersistentnog inhibitora, ili kroničnim davanjem inhibitora u hrani (130, 131). Ti su nalazi od praktičnog značenja, jer pokazuju, da pri svakoj kroničnoj ekspoziciji organofosfornim spojevima možemo očekivati, da će određeni dio kolinesteraze prijeći u drugi, ireverzibilni stadij inhibicije, i tada samo novo-sintetizirana kolinesteraza može nadomjestiti inaktivirani enzim.

2.2 Nukleofilni reagensi kao reaktivatori inhibirane kolinesteraze

Činjenica, da se dimetil- i dietilfosforilirana kolinesteraza – dok je inhibicija u prvom stadiju – reaktivira uz prisustvo relativno slabog nukleofilnog reagensa, kao što je voda (usporedi 2.1.3), navela je biokemičare da istražuju druge nukleofilne reagense, koji bi eventualno mogli poslužiti u terapiji trovanja organofosfornim inhibitorima.

2.2.1 Pokusi *in vitro*

U posljednjih nekoliko godina istražen je velik broj različitih hidroksamskih kiselina i oksima u cilju reaktivacije inhibirane kolinesteraze, među kojima se kao najaktivniji reaktivator pokazao piridin-2-aldoksim metil-jodid (44, 142), a zatim pikolin-hidroksamska kiselina (141), bis-hidroksi-iminoaceton i mono-hidroksi-iminoaceton (40, 45). Reaktivacija inhibiranog enzima pomoću vode (4), hidroksilamina (137) ili pomoću bis-hidroksi-iminoacetona (45) pokazuje zavisnost od temperature i ima visoku energiju aktivacije. Reaktivacija pomoću hidroksilamina može se spriječiti dodavanjem pozitivno nabijenih iona, kao što su te-

trametil- ili tetraetil- amonij (137). Trimetilamin smanjuje reaktivaciju izazvanu metil-jodidom nikotin-hidroksamske kiseline i piridin-2-aldoksim metil-jodidom (80, 81), a acetilkolin reaktivaciju nakon piridin-2-aldoksim metil-jodida (44). Ti su rezultati potpuno u skladu s rezultatima dalje opisanih istraživanja, koja je vršio *Wilson* (139).

Budući da se i kolin u određenoj mjeri pokazao aktivnim, iako se njegova alkoholna grupa jedva može smatrati nukleofilnom, *Wilson* (139) je istražio koliko pridonosi anionska strana aktivnog centra (koja je kod fosforiliranog enzima slobodna) pri reaktivaciji enzima. On je isporedio 7 parova spojeva, koji su svi sadržavali funkcionalnu grupu, ali su se parovi među sobom razlikovali u tome, što su jedni sadržavali kationski (kvaternizirani) centar u molekuli, a drugi nisu. Istražujući njihovo djelovanje na dietil- i diizopropilfosforiliranoj kolinesterazi, *Wilson* je našao, da prisutnost kationskog centra u molekuli reaktivatora pospješuje reaktivaciju. To je naročito izraženo kod dietil-fosforiliranog enzima, gdje ne postoje – kako on smatra – steričke smetnje od strane dialkilnih grupa, a koje kod diizopropilfosforiliranog enzima djelomično zastiru anionsku stranu enzima. Na osnovu toga *Wilson* zaključuje, da inhibirana kolinesteraza ima neoštećenu anionsku stranu i da ona može pridonijeti procesu reaktivacije. Premda je reaktivatorsko djelovanje opisano kod velikog broja oksima bez pozitivnog naboja (40), teško bismo mogli protumačiti činjenicu, da je tercijalni piridin-2-aldoksim milijun puta slabiji reaktivator dietil-fosforilirane kolinesteraze od kvaterniziranog piridin-2-aldoksim metil-jodida (142), kad ne bismo pretpostavili, da pritom sudjeluje anionska strana aktivnog centra enzima.

Treba istaknuti, da oksimi i hidroksamske kiseline imaju dvojako djelovanje, t. j. oni djeluju kao reaktori, kad reagiraju direktno sa slobodnim inhibitorom (68), i kao reaktivatori, kad djeluju na fosforilirani enzim (40). Reaktivatorsko djelovanje tih spojeva, za razliku od njihova reaktorskog djelovanja, t. j. direktnog vezanja na slobodni inhibitor, ne zavisi prvenstveno od njihove konstante disocijacije. *Green* i *Smith* (69, 70, 71) iznose svoja kinetička istraživanja reaktivacije fosforiliranog enzima pomoću reaktivatora. Proces reaktivacije teče brzinom, koja je određena jednadžbom tipa *Michaelis-Mentenove* jednadžbe, i brzina reaktivacije zavisiće ne samo od reaktivnosti reaktivatora u odnosu na organofosforne spojeve već i o čvrstoći prvotnog kompleksa fosforiliranog enzima i reaktivatora, kao i o prikladnoj orijentaciji reaktivatora u tom kompleksu. Na temelju takvih razmatranja autori su mogli protumačiti mnoga neslaganja s obzirom na relativnu reaktivnu moć pojedinih reaktivatora. Piridin-2-aldoksim metil-jodid, dosad najbolji poznati reaktivator *in vitro*, formira čvrsti kompleks s fosforiliranim enzimom ($K = 1.4 \times 10^{-4}$ mol/l za dietilfosforilirani enzim i 8×10^{-4} mol/l za diizopropilfosforilirani enzim). Piridin-4-aldoksim metil-jodid, koji je mnogo slabiji reaktivator, čini mnogo slabije komplekse i stoga ima manji K . Reaktivatori mogu stvarati komplekse na dvije odvojene

strane na fosforiliranom enzimu. Anionska strana vezat će reaktivatore, koji imaju kationske centre kao što su piridin-aldoksim metil-jodidi, a druga će strana vezati reaktivatore, koji imaju karbonilni supstituent, kao što su na primjer 2-okso-aldoksimi. Te dvije klase reaktivatora mogu se lakše razlučiti, ako odredimo utjecaj elektrolita na brzinu reaktivacije. Elektroliti usporuju reaktivaciju, koju viši piridin-2-aldoksim metil-jodid, vjerojatno zbog kompeticije između kationa elektrolita i oksima za anionsku stranu fosforiliranog enzima. Kationi elektrolita ubrzavaju, međutim, reaktivaciju fosforiliranog enzima pomoću 2-okso-aldoksima, no kako se to odvija, nije poznato.

2.2.2 Pokusi *in vivo*

Beryl Askew (11) je istraživala djelovanje 23 oksima i hidroksamskih kiselina na štakorima otrovanim Sarinom. Sarin je aplicirala subkutano, a oksime je davala intraperitonealno, ili 15 minuta prije (t. zv. »profilaktična doza«) ili 30 ili više sekunda nakon davanja inhibitora (t. zv. »terapijska doza«). Na temelju preliminarnih pokusa mogla je izdvojiti 8 oksima, koji su se pokazali kao najaktivniji kod životinja otrovanih sa $2 \times LD_{50}$ Sarina: mono-izo-nitrozoacetone (MINA), diacetyl monoksim (DAM), 2-okso-3-oksiminopentan, 2-metil-3-oksimino-4-oksopentan, izo-nitrozo-dietilketon, salicil aldoksim, tri-izo-nitrozopropan i glioksim. Hidroksamske kiseline nisu bile djelotvorne. Prvih pet navedenih oksima pokazali su sličnu aktivnost, ako su bili aplicirani u ekvimolarnim koncentracijama 15 minuta prije injiciranja Sarina, povišivši LD_{50} za oko 5 puta. B. Askew je zatim potanje istraživala mehanizam djelovanja oksima *in vivo* i u tu svrhu je upotrebila mono-izo-nitrozoacetone (MINA) i diacetyl monoksim (DAM). MINA je jedan od otrovnijih oksima i djeluje i kao reaktor, reagirajući direktno sa Sarinom, i kao reaktivator inhibirane kolinesteraze. DAM je znatno manje toksičan, ali je mnogo slabiji reaktor i reaktivator. »Profilaktična doza« DAM-a od 250 mg/kg povišila je toleranciju na Sarin 58 puta. MINA, koji duguje svoju toksičnost stvaranju HCN-a u toku razgradnje u organizmu (14), bio je upotrebljen u dozama svega do 35 mg/kg, i tom je dozom LD_{50} Sarina bila povećana za 5–6 puta. Ako je DAM bio apliciran kao »terapijska doza«, t. j. nakon davanja Sarina, njegov je učinak bio znatno manji.

MINA i DAM pokazali su se jednako djelotvorni u spasavanju životinje, ako su bili aplicirani u ekvivalentnim dozama u času nastupa simptoma. Postojala je međutim očigledna razlika u simptomima, koje su pokazivale spasene životinje. Životinje tretirane s MINA-om oporavljale su se brzo, dok su simptomi otrovanja kod životinja tretiranih s DAM-om trajali nekoliko sati. Kako su znakovi otrovanja već postojali u času injiciranja bilo MINA-a ili DAM-a, razlika u njihovu terapijskom učinku mora biti uvjetovana njihovom sposobnošću reaktivi-

ranja Sarinom inhibirane kolinesteraze. MINA je jedan od najbržih reaktivatora *in vitro* za inhibiranu kolinesterazu Sarinom, dok je DAM oko 5 puta sporiji. Ti rezultati pokazuju važnost reaktivacije kolinesteraze pri terapiji otrovanja antikolinesterazama.

Dultz, Epstein, Freeman i drugi (54) proučavali su grupu od 20 različitih oksima na miševima i štakorima otrovanim Sarinom. I u njihovim se istraživanjima, poput onih, koje je vršila B. Askew, DAM pokazao kao najaktivniji među istraženim oksimima. Autori su ujedno istražili farmakološka svojstva, distribuciju i ekskreciju DAM-a na štakorima i psima.

Dok je djelotvornost DAM-a i MINA-a vrlo velika kod štakora otrovanih Sarinom, njihovo je djelovanje na svim drugim ispitivanim vrstama oko 10 puta manje. Tome, međutim, nije uzrok razlika u brzini resorpcije antidota kroz peritoneum (11). Poznato je, da postoje izrazite razlike u reagiranju pojedinih životinjskih vrsta na jedan isti organofosforni spoj, a isto tako jedna životinjska vrsta reagira različito na različite antikolinesteraze. To je vjerojatno uvjetovano brzinom, kojim inhibitor stiže do glavnog mjesta svog djelovanja. Prema tome jednako se može očekivati, da će djelotvornost određenog reaktivatora varirati s obzirom na vrstu životinje i određeni inhibitor, bez obzira na brzinu reagiranja oksima s inhibitorom ili inhibiranom kolinesterazom *in vitro*. Piridin-2-aldoksim metil-jodid (P_2AM) je primjer dobrog reaktivatora i reaktivatora *in vitro* za Sarin. Dok MINA i P_2AM reagiraju otprilike jednakom brzinom kao reaktivatori, DAM reagira mnogo sporije. Unatoč tome DAM i MINA su pri ekvivalentnim dozama pokazali jednaki djelotvorni učinak kod životinja otrovanih Sarinom, a P_2AM se pokazao nedjelotvoran (11, 33, 101).

P_2AM se, međutim, pokazao djelotvoran kod miševa otrovanih Paraoxonom (82, 90), TEPP-om (82), kao i kod miševa i štakora otrovanih Parathionom (118). Zaštitno djelovanje P_2AM -a za miševе otrovane DFP-om bilo je neznatno (82). Zanimljiv je, međutim, Hobbigerov nalaz (82), da P_2AM reaktivira *in vivo* dietilfosforiliranu kolinesterazu krvi, ali ne djeluje na kolinesterazu mozga, koja i dalje ostane inaktivirana. Vjerojatno je tome uzrok teže prolaženje P_2AM -a kroz branu krv-mozak, zbog njegova pozitivnog naboja. Zaštitni se učinak P_2AM -a mora prema tome povezati s drugim djelovanjima, a ne s onima na kolinesterazu mozga. Klučik (93) je histokemijskom metodom dokazao reaktivatorsko djelovanje P_2AM -a na kolinesterazi motornih ploča kod miševa otrovanih Paraoxonom. Dok P_2AM smanjuje toksičnost Parathiona za štakore i miševе, DAM nasuprot povećava njegovu toksičnost, ubrzavajući nastup i razvoj kolinergičnih simptoma (118).

Ispoređivanje kemijskih, biokemijskih i terapijskih svojstava pojedinih oksima ukazuje na mnoge zanimljive anomalije, na koje je upozorila B. Askew (13). Sposobnost oksima da reagiraju s organofosfornim spojevima nije dovoljna za tumačenje njihova terapijskog učinka, no njihova sposobnost reaktiviranja može protumačiti dio njihova terapijskog

skog djelovanja (11, 121). Interpretacija djelovanja reaktivatora znatno je otežčana, budući da se ustvari ne zna minimum slobodne (aktivne) kolinesteraze, koji je potreban, da životinja preživi otrovanje. Znamo, da organofosforni spojevi mogu ispoljiti svoj učinak bilo centralno ili periferno, ili – obostrano. Relativno značenje tih učinaka zavisit će koliko o samom inhibitoru, toliko i o vrsti životinje (37). Distribucija oksima nakon aplikacije varira s obzirom na pojedini oksim, pa je i to faktor, koji može protumačiti njihovo nejednoliko djelovanje u nekim slučajevima.

Kad raspravljamo o djelovanju oksima i drugih nukleofilnih reagensa, treba imati na umu lanac događaja, koji se zbivaju u organizmu: (1) inhibicija kolinesteraze, (2) akumulacija acetilkolina, (3) smrt zbog anoksije. Oksimi nisu antagonisti acetilkolina, a ne suzbijaju ni anoksiju. Odatle proizlazi pojačanje njihova djelovanja atropinom ili umjetnim disanjem (12, 29, 33, 101).

3. FARMAKOLOGIJA

Kako je već prije (2.1.1) spomenuto, reakcija kolinesteraze s organofosfornim spojem dovodi do inaktivacije enzima; prema tome je otrovanje organofosfornim spojevima praćeno akumulacijom acetilkolina i odgovarajućim simptomima (26, 51, 126).

Spomenut ćemo kratko neke fiziološke podatke o acetilkolinu, koji su od naročitog interesa za razumijevanje farmakološkog djelovanja organofosfornih spojeva.

Smatra se, da se acetilkolin nalazi u organizmu na mnogim mjestima u inaktivnom obliku (vezan na protein), i da određeni fiziološki podražaj uzrokuje prijelaz inaktivnog oblika u aktivni (109). Osnovna je funkcija acetilkolina da omogućí prijenos nervnog podražaja izazivajući depolarizaciju onih područja, gdje postoji anatomska diskontinuitet između živca i efektnog organa (120). Takvi anatomske diskontinuiteti postoje u mozgu i leđnoj moždini (na mjestu živčanih sinapsa), u autonomnim ganglijima (gdje preganglionarno vlakno tvori sinapsu sa stanicom postganglionarnog vlakna), u žlijezdama (na mjestima između nervnih vlakana i sekretornog aparata), u voljnim mišićima (u motornoj ploči), u organima, koje opskrbljuje kranio-sakralno autonomno živčevlje i t. d.

Učinke acetilkolina dijelimo u tri grupe: (1) muskarinski učinci, (2) nikotinski učinci i (3) centralni učinci. Muskarinskim učincima acetilkolina nazivamo one pojave, koje acetilkolin uvjetuje u sinapsama postganglionarnih parasimpatičnih vlakana. Možemo ih imitirati muskarinom (otrov prisutan u gljivi *Amanita muscaria*), a suzbiti se mogu atropinom. Treba napomenuti, da atropin ne ometa lučenje acetilkolina, već sprečava djelovanje acetilkolina na mjestima, gdje se ispoljuju njegovi

muskarinski učinci, zaštićujući receptore od djelovanja acetilkolina (97). Podražajno djelovanje acetilkolina na sinapsama voljnih vlakana, kao i na preganglionarnim vlaknima može se imitirati malim dozama nikotina, pa se to djelovanje acetilkolina naziva nikotinskim. Antagonistički efekt na tim mjestima pokazuju alkaloidi kurarea i velike doze nikotina. I acetilkolin, u velikim dozama, blokira te sinapse. Atropin je ovdje bez djelovanja. Injiciranje minimalnih količina acetilkolina (ili fizostigmina) u mozgovnu komoru izaziva kod ljudi produženo spavanje, otežano disanje i nepravilni rad srca. Ti se simptomi (uz druge) pripisuju centralnom djelovanju acetilkolina i dijelom ih možemo suzbiti atropinom.

3.1 Akutni učinci

Organofosforni insekticidi ulaze u organizam preko gastrointestinalnog trakta, respiratornog trakta ili preko kože. Akutni učinci na sisavcima u biti su slični za sve organofosforne spojeve i gotovo svi simptomi otrovanja mogu se protumačiti hiperaktivnošću kolinergičnih elemenata u živčanom sistemu.

Djelovanje organofosfornih spojeva na miškulaturu bronha i ostalo glatko mišićje, kao i na žlijezde (bronhalne, suzne i slinovnice) odgovara nikotinskom učinku acetilkolina, i atropin ovdje nema terapijskog atropinom. Djelovanje organofosfornih spojeva u smislu poremećenja prijenosa impulsa u ganglijskim i neuromuskularnim sinapsama odgovara nikotinskom učinku acetilkolina i atropin ovdje nema terapijskog efekta. Manje se zna o djelovanju acetilkolina u mozgu; ako je centralno djelovanje organofosfornih spojeva vezano uz letalni ishod otrovanja, pita se da li to djelovanje zavisi od njihova učinka na mozgovnu kolinesterazu ili ne. Neki naime organofosforni spojevi (na pr. Schradan) ubijaju štakora, a da pritom ne inhibiraju kolinesterazu mozga (60).

Čini se, da je kod sisavaca letalni ishod akutnih oštećenja organofosfornim spojevima uvijek uzrokovan ugušenjem. Respiracija može zatajiti (1) zbog spazama bronha i obilne bronhalne sekrecije, a to će prouzročiti mehaničku opstrukciju dišnih putova, (2) zbog paralize dijafragme i pomoćnih respiratornih mišića uslijed neuromuskularnog bloka i (3) zbog klijenuti respiratornog centra. Candole i suradnici (37) analizirali su ta tri faktora i našli, da je klijenut respiratornog centra u većini slučajeva odlučujući faktor. Međutim, koji će od ta tri faktora dominirati, zavisi od svojstava organofosfornog spoja i od vrste eksperimentalne životinje. Kod majmuna se klijenut centra za disanje pokazala kao jedini uzrok prestanka respiracije, budući da su bronhokonstrikcija i neuromuskularni blok respiratornih mišića bili neznatno izraženi u momentu nastupa apnoe. Autori zaključuju, da je depresija centra za disanje uzrokovana djelovanjem organofosfornih spojeva na centralni nervni sistem, te da će atropin ispoljiti svoje zaštitno djelovanje kod centralnog učinka otrova, kao i kod bronhokonstrikcije, dok će u slučaju neuromusku-

larnog bloka jedino umjetno disanje biti od koristi. Takva su naziranja u skladu s rezultatima drugih autora, koji su našli mnogo jači zaštitni učinak, kad su atropin kombinirali s umjetnim disanjem (20) ili kad su antagoniste muskarinskog djelovanja kombinirali s antagonistima nikotinskog djelovanja acetilkolina (38, 98, 115).

3.2 Kronični učinci

Pored naprijed navedenih akutnih učinaka neki organofosforne spojevi izazivaju kod ljudi trajan neurotoksični učinak (30, 31, 83). Sličan učinak može se eksperimentalno izazvati na pticama (24). Nakon preboljele prve faze akutnih simptoma otrovanja kod životinja se postepeno razvija paraliza nogu, koja je uzrokovana demijelinizacijom perifernih živaca i određenih živčanih putova u leđnoj moždini. Zna se, da demijelinizaciju izazivaju ovi organofosforne spojevi: di-izopropil i dietil-fluorofosfonat, bis(mono-izopropilamino) fluorofosfin oksid i tri-ortokrezil fosfat (24, 55).

Zasad se ništa ne zna o mehanizmu ovog specifičnog djelovanja, niti je poznato koje su karakteristike organofosforne spoja odgovorne za takvo djelovanje. Svakako to nije učinak kronične ekspozicije; oštećenje se razvija nakon preboljelog akutnog otrovanja, obično jedan do dva tjedna nakon nestanka tipičnih kolinergičnih simptoma otrovanja.

4. EKSPERIMENTALNA TOKSIKOLOGIJA

S obzirom na akutnu toksičnost organofosforne insekticidi sežu od vrlo toksičnih spojeva do spojeva, kojih toksičnost nije veća od toksičnosti DDT-a ili BHC-a (insekticida iz grupe kloriranih ugljikovodika. Relativna toksičnost otrova ocjenjuje se određivanjem akutne LD_{50} vrijednosti, t. j. doze (izražene u miligramima na kilogram tjelesne težine), pri kojoj ugiba 50% otrovanih životinja. U literaturi često nalazimo znatne razlike u vrijednostima LD_{50} za isti organofosforne insekticid. Te su razlike uvjetovane u prvom redu stepenom onečišćenja istraživanog spoja, a i nekim drugim faktorima (7). Faktori, koji uvjetuju varijabilnost reakcije pri ocjeni akutne toksičnosti, razmatrani su u zasebnom prikazu (127).

U tablici 5 navedene su 50% letalne doze za muške i ženske štakore nakon akutne oralne i dermalne aplikacije nekih organofosforne insekticida (128).

Jakost i trajanje simptoma, kao i njihov karakter, s obzirom na ispoljavanje simptoma od strane centralnog, odnosno perifernog nervnog sistema, zavisi od fizikalnih i kemijskih svojstava određenog spoja. Budući da se njihovo toksično djelovanje temelji na svojstvu inhibiranja kolinesteraze, njihova će toksičnost u velikom dijelu zavisiti od faktora, koji su izneseni u poglavlju biokemije organofosforne spojeva. Kod

Tablica 5

Urijednosti LD_{50} dobivene na muškim i ženskim štakorima nakon akutne oralne i dermalne aplikacije organofosforinih insekticida (128)

Spoj	Oralna LD_{50} mužjaci	(mg/kg) ženke	Dermalna LD_{50} mužjaci	(mg/kg) ženke
Chlorthion	880.0	980.0	1500.0—4500.0	4100.0
Systox	6.2	2.5	14.0	8.2
Diazinon	108.0	76.0	—	108.0
Dipterex	630.0	—	—	—
Malathion	1375.0	1000.0	4444.0	4444.0
Parathion	13.0	3.6	21.0	10.9
TEPP	2.0	1.2	—	—

nekih organofosforinih spojeva brzina nastupa simptoma zavisit će od konverzije slabo aktivnog, ili neaktivnog spoja u aktivni inhibitor. Spojevi, koji imaju na fosforini atom dvostrukom vezom vezan sumpor (P = S spojevi), vrlo su slabi inhibitori i oksidacijom u organizmu prelaze u odgovarajući P = O analog. Taj proces se zbiva u jetri sisavaca (47), a u manjoj mjeri i u drugim organima (96). Trajanje simptoma nakon jednokratne subletalne doze zavisit će od brzine vraćanja aktivnosti inhibirane kolinesteraze, što je uvjetovano alkilnim grupama u dialkildifosforiliranom enzimu (vidi 2.1.3), kao i persistencijom inhibitora u organizmu (131). Sposobnost organofosforinog spoja da djeluje kao inhibitor kolinesteraze *in vivo* zavisit će od uvjeta, da ne bude razgrađen u organizmu prije nego dospije do kolinesteraze. Opisani su enzimi, koji razgrađuju organofosforne spojeve. Aldridge (3) je, na primjer, opisao enzim, koji hidrolizira Paraoxon i ustvrdio njegovu identičnost s A-esterazom seruma sisavca. Augustinsson i Heimbürger su istraživali određenu grupu enzima, koji hidroliziraju organofosforne spojeve i nazvali ih zajedničkim imenom fosforil-fosfataze (17, 18).

Pri sintezi novih pesticida iz grupe organofosforinih spojeva nastoji se pronaći spoj s niskom toksičnošću za sisavce, a visokom otrovnošću za insekte. Isporedimo li toksičnost organofosforinih spojeva navedenih u tablici 5 vidimo, da su manje toksični spojevi (Chlorthion, Diazinon, Dipterex i Malathion) bilo dimetilfosfatni esteri ili tiono-fosfati (P = S spojevi), ili oboje, kao što je slučaj za Malathion i Chlorthion. U takvom će slučaju spora oksidacija Malathiona i Chlorthiona u aktivni inhibitor omogućiti, da relativno brzo vraćanje aktivnosti dimetilfosforiliranog enzima dođe još više do izražaja u smanjenju akutne toksičnosti dotičnog spoja (22). Čini se, da su biokemijski procesi, od kojih zavisit će djelovanje organofosforinih spojeva, vrlo slični kod sisavaca i insekata (103), i smanjena toksičnost za sisavce praćena je obično istovremenim smanjenjem insekticidne aktivnosti određenog spoja (52). Malathion,

međutim, unatoč svojoj znatno manjoj toksičnosti za sisavce postiže željeni insekticidni učinak, kad se primjenjuje u koncentraciji svega 2 ili 3 puta većoj od koncentracije Parathiona (75).

Premda se prisutnost inhibitora može dokazati u krvi još nekoliko sati nakon intravenozne aplikacije nekih organofosfornih spojeva (129, 130), ti se spojevi u pravilu brzo razgrađuju i zbog toga ne nagomilavaju u organizmu. Njihova kronična toksičnost zavisi najvećim dijelom, ako ne potpuno, od njihova inhibitornog djelovanja na kolinesterazu. Od velike je važnosti da se u toku kronične ekspozicije, ako je došlo do prekomjerne apsorpcije otrova, učinak organofosfornih inhibitora na kolinesterazu sumira, a to znači, da se aktivnost kolinesteraze progresivno smanjuje. Prema tome, uzastopne subkliničke doze otrova izazvat će najposlije izbijanje simptoma, koji su jednaki simptomima kod akutnog otrovanja. Podaci o kroničnoj toksičnosti određenog spoja od značenja su ne samo s obzirom na radnike, koji su profesionalno izloženi tim otrovima, već i za ostalo stanovništvo i domaće životinje, koje konzumiraju hranu tretiranu organofosfornim insekticidima. Rezultati kroničnog otrovanja pokusnih životinja Parathionom (23), Systoxom (25), Schradanom (25), Chlorthionom (53), Diazinonom (34) ili Malathionom (75) su pokazali, da su razlike u kroničnoj toksičnosti ovih spojeva slične odnosima kod njihove akutne toksičnosti. Tako su, na primjer, u kroničnom pokusu sa 50 p. p. m. Systoxa u hrani izazvani simptomi i uginuće određenog broja eksponiranih štakora, dok 1000 p. p. m. Malathiona nije izazvalo nikakvih simptoma na trovanim životinjama.

Eksperimentalni podaci o akutnoj i kroničnoj toksičnosti služe pri ocjenjivanju opasnosti po zdravlje, koju određeni organofosforni spoj predstavlja za eksponirane ljude. Treba, međutim, istaći, da je primjena eksperimentalnih podataka od životinje na čovjeka vrlo teška i pritom treba uvijek uračunati veliki »faktor osiguranja«. Zanimljiv je nalaz *Frawleya* i suradnika (59), da paralelno davanje dvaju organofosfornih spojeva znatno povećava njihovu akutnu i kroničnu toksičnost za štakore, a naročito za pse. Tu činjenicu treba imati na umu pri ocjeni opasnosti po zdravlje, koju predstavlja kombinirana ekspozicija dvjema organofosfornim spojevima.

5. KLINIČKA TOKSIKOLOGIJA

5.1 Simptomatologija

Subjektivni simptomi otrovanja organofosfornim spojevima uključuju glavobolju, vrtoglavicu, zamagljen vid, mučninu, grčeve u trbuhu, proljev, pritisak u grudima i nervozu. Od objektivnih simptoma najčešći su znojenje, mioza, suženje, salivacija, plućni edem, cijanoza, mišićne fascikulacije (napose mimične muskulature), grčevi, koma i nestanak re-

Tablica 6

Simptomi otrovanja organofosforim spojevima

Mjesto djelovanja	Simptomi
<i>I. Muskarinski učinci</i>	
Bronhalno stablo	Osjećaj stezanja u prsnoj koži s produljenim, hroptavim ekspirijem, dispnoa, lagana bol u prsnoj koži, pojačana bronhalna sekrecija, edem pluća, cijanoza.
Gastro-intestinalni trakt	Gubitak teka, mučnina, povraćanje, abdominalni grčevi, pritisak u epigastriju i ispod prsne kosti (kardiospazam?), s osjećajem »žarenja oko srca«, podrigivanje, proljev, tenezmi, nekontrolirana defekacija.
Znojne žlijezde	Pojačano znojenje.
Žlijezde slinovnice	Pojačana salivacija.
Suzne žlijezde	Pojačano suzenje.
Srce	Lagana bradikardija.
Zjenice	Lagana mioza, kasnije jače izražena.
Corpus ciliare	Nejasan vid.
Mokraćni mjehur	Učestalo, nekontrolirano mokrenje.
<i>II. Nikotinski učinci</i>	
Poprečno prugasti mišići	Lako zamaranje, slabost, fascikulacije, trzaji i grčevi mišića, opća slabost, slabost respiratornih mišića, s dispnoom i cijanozom.
Simpatični gangliji	Bljedoća, katkad povećan krvni tlak.
<i>III. Centralni učinci</i>	
	Vrtoglavica, napetost, osjećaj tjeskobe, nervoza, uznemirenost, emocionalna labilnost, san obilat snovima, nesanica, teški snovi (pavor nocturnus), glavobolja, tremor, povučena i depresija, izbijanje sporih valova povišene voltaže u EEG-u napose prilikom hiperventilacije, pospanost, otežana koncentracija, sporost prisjećivanja, zbunjenost, nejasan govor, ataksija, opća slabost, koma, odsutnost refleksa, Cheyne-Stokesovo disanje, grčevi, depresija respiratornih i cirkulatornih centara s dispnoom i padom krvnog tlaka.

fleksa i kontrole sfinktera. Posljednje nabrojene simptome opažamo samo pri teškim, uznapredovalim otrovanjima; međutim ni tada nije isključena mogućnost povoljnog ishoda, nastavimo li energično s terapijom. Tablica prikazuje simptome, koji se razvijaju u toku otrovanja organofosfornim spojevima, svrstane prema farmakološkim učincima (72).

Treba istaknuti, da mioza, koja se prije smatrala kao važan i koristan dijagnostički znak otrovanja, ne mora uvijek biti izražena ili se može razviti tek vrlo kasno; opisani su štoviše slučajevi otrovanja s midrijazom (49). Kod slučajne kožne ekspozicije isprva se javljaju manje alarmantni simptomi (vrtoglavica, mioza, nejasan vid), dok teži simptomi, kao što su mučnina, abdominalni grčevi, fascikulacije mišića i t. d. nastupaju obično tek nakon 2 do 8 sati. Opisani su slučajevi (ubijstva i suicidi), gdje je do smrti došlo neposredno nakon ingestije otrova. Organofosforni spojevi, koji tek konverzijom u organizmu prelaze u aktivni inhibitor, mogu izazvati zakašnjeli nastup simptoma (27).

5.2 Laboratorijski nalazi

Većina laboratorijskih nalaza u suštini je normalna, izuzevši razinu aktivnosti kolinesteraze, koja može biti znatno snižena. Kolinesteraza nije jednakomjerno oštećena u svim organima. To zavisi u prvom redu o distribuciji otrova, odnosno njegova metabolita u organizmu. Određivanje aktivnosti kolinesteraze eritrocita, seruma ili krvi služi nam ne samo kod dijagnoze otrovanja, već nam je ta metoda od vrlo velike koristi za utvrđivanje prekomjerne apsorpcije otrova kod radnika izloženih djelovanju organofosfornih insekticida.

Mnogi su autori odredili normalne vrijednosti kolinesteraze u krvi za određenu populaciju i istražili granice, u kojima one variraju kod pojedinaca (16, 36, 62, 64, 144). *Wolfsie* i *Winter* (144) navode, pored svojih rezultata, srednje vrijednosti aktivnosti kolinesteraze eritrocita i kolinesteraze seruma, koje su dobili drugi američki autori, određivši aktivnost kolinesteraze Michelovom metodom (104). Te se vrijednosti nalaze u ovim granicama:

kolinesteraza eritrocita	0,67 — 0,86 pH jedinica/sat
kolinesteraza seruma	0,70 — 0,97 pH jedinica/sat.

Smatra se, da vrijednosti od 0,5 ili manje predstavljaju za kolinesterazu eritrocita ili seruma patološko sniženje za većinu osoba. Unatoč tome, osobe, koje duže rade s organofosfornim insekticidima, mogu podnijeti mnogo veće sniženje (do 0,2 ili manje), a da se ne pojave nikakvi subjektivni ili objektivni simptomi (128). U praksi se može smatrati, da je ekspozicija organofosfornim insekticidima jedini uzrok izraženog sniženja aktivnosti kolinesteraze. Neke bolesti jetre i stanja pothranjenosti mogu uzrokovati sniženje aktivnosti kolinesteraze seruma (89).

Principi laboratorijskih i terenskih metoda za određivanje aktivnosti kolinesteraze izneseni su u zasebnom prikazu (117).

Apsorpciju nekih organofosfornih spojeva možemo odrediti analizom njihovih metaboličkih produkata u mokraći. Tako se određivanje paranitrofenola u urinu koristi za ocjenu ekspozicije Parathionom. Ta je metoda relativno jednostavna i osjetljiva (99, 100).

5.3 Patološka anatomija

Patološko-anatomski nalaz ne otkriva nikakvih makroskopskih ni mikroskopskih anomalija osim onih, koje vidimo kod plućnog ili mozgovnog edema, ili kod sekundarnih promjena izazvanih konvulzijama.

5.4 Diferencijalna dijagnoza

Ako nemamo mogućnost određivanja aktivnosti kolinesteraze, mogu se otrovanja organofosfornim spojevima katkada zamijeniti toplinskim udarom ili kolapsom, gastroenteritisom, pneumonijom ili drugim teškim respiratornim infekcijama. Blaga otrovanja često treba razlikovati od astme ili od običnog straha s različitim psihosomatskim manifestacijama, napose u kolektivu, koji zna, da su se unutar kolektiva neki radnici otrovali.

6. TERAPIJA

Specifični antidot za muskarinske učinke, a i za neke centralne učinke kod otrovanja organofosfornim spojevima je atropin. Budući da bolesnici otrovani organofosfornim spojevima pokazuju povećanu toleranciju za atropin (67), treba ga davati u velikim količinama i često (1–2 mg atropin sulfata svaki sat, intramuskularno ili intravenozno, do 10–20 mg na dan) (128). *Grob* (72) predlaže kod teških otrovanja aplikaciju još većih doza atropina: 2–4 mg intravenozno ili intramuskularno do 48 mg na dan.

Kod terapije atropinom mnogo je veća opasnost hipodoziranja od hiperdoziranja. *Freeman* i *Epstein* (61) su analizirali 46 teških slučajeva otrovanja Parathionom i TEPP-om i istakli važnost trajne i adekvatne terapije. Od 46 otrovanih 23 bolesnika su podlegla otrovanju, bilo zbog zakašnjele terapije, ili je terapija bila inadekvatna.

Kod svih lakših slučajeva otrovanja treba podržavati blagi stupanj atropinizacije 24 sata, a kod težih slučajeva barem 48 sati. Treba imati na umu da prva doza atropina može polučiti znatno olakšanje, koje, međutim, može biti kratkotrajno, i ako se prekine atropinizacijom, razvit će se teška slika otrovanja.

Atropin će suzbiti pogibeljne simptome, kao što je sekrecija i spazmi bronha, ali, nažalost, atropin ne će suzbiti nikotinski učinak acetilkolina, a ni sve centralne učinke, koji se razvijaju u toku otrovanja organo-

fosfornim spojevima. Zbog toga treba osobitu pažnju obratiti respiraciji. Bolesnik treba da bude pod stalnom paskom i u slučaju potrebe treba primijeniti umjetno disanje – mehaničko, ili još bolje insuflaciju kisika, pod malo povišenim pritiskom (72, 88). Ne smije se davati atropin cijanotičnom bolesniku, već treba najprije umjetnim disanjem riješiti bolesnika cijanoze, a zatim aplicirati atropin.

Pošto je cijanoza nestala i pošto smo injicirali atropin, treba smjesta pristupiti temeljitoj dekontaminaciji otrovanoga. S gumenim rukavicama na rukama odstranjuje se odjeća, a koža bolesnika pere se temeljito vodom i sapunom. Za dekontaminaciju dobro je upotrebiti blage otopine alkalija, jer organofosforni spojevi brzo hidroliziraju u alkaličnom mediju. Postoji li sumnja, da je otrov progutan, treba izazvati povraćanje (kod bolesnika, koji je pri svijesti) i nakon davanja vode ili mlijeka treba izazvati povraćanje ponovo. Ako nam ne pođe za rukom, treba izvršiti ispiranje želuca sondom.

Ako se razvila obilna bronhalna sekrecija prije nego je atropin počeo djelovati, treba odstraniti sekret iz dišnih putova kroz nos isisavanjem pomoću katetera. U ekstremnim slučajevima vrši se traheotomija. Nemir bolesnika treba suzbiti barbituratima kratkog djelovanja.

Morfin, teofilin i slični preparati su kontraindicirani. Treba izbjegavati infuzije zbog velike količine tekućine u respiratornom traktu.

Kod vrlo teških slučajeva otrovanja treba primijeniti terapiju ovim redom (128):

- (1) umjetno disanje, dok ne nestane cijanoze;
- (2) atropin, 2 mg intravenozno. Tu dozu treba ponavljati svakih 5 do 10 minuta sve do znakova atropinizacije (suha zacrvenjela koža i tahikardija do 140/min.);
- (3) dekontaminacija kože ili ispražnjavanje želuca;
- (4) simptomatska terapija.

S obzirom na terapijske učinke, koje su neki oksimi ispoljili na pokusnim životinjama otrovanim organofosfornim spojevima (vidi 2.2.2), može se očekivati, da će spojevi iz te grupe doskora naći primjenu u terapiji otrovanih ljudi ili korisnih domaćih životinja. Ustvari, već je opisano korisno djelovanje piridin-2-aldoksim metil-jodida kod ljudi otrovanih Parathionom (111).

Aktivnost kolinesteraze u slučaju ireverzibilne inhibicije vraća se na normalu veoma sporo i zavisi od brzine sintetiziranja novog enzima. Nakon jakog sniženja, aktivnost kolinesteraze seruma vratit će se na normalnu vrijednost za oko 30 do 40 dana, dok će se aktivnost kolinesteraze eritrocita vratiti na prvobitnu vrijednost za 80 do 100 dana (72). Prema tome, osobe, koje su preboljele otrovanje, ne smiju biti ponovo izložene otrovu barem iduća 3 mjeseca.

7. PREVENCIJA

Profesionalna otrovanja organofosforinim insekticidima možemo spriječiti preventivnim mjerama, koje su sadržane u ova tri osnovna principa: (1) neprekidan oprez pri radu, (2) kolektivne zaštitne mjere (na pr. dovoljna i pouzdana ventilacija) i lična zaštita (zaštitno odijelo i respiratori) i (3) nadzor nad radnim uvjetima.

Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje primjenu pesticida – a među njima i primjenu nekih organofosforinim insekticida – u širokim razmjerima pri suzbijanju prenosilaca različitih bolesti i zbog toga obraća veliku pažnju problemima zaštite kod primjene tih otrova. Dalje navedena izlaganja temelje se uglavnom na prijedlozima i naziranjima stručnjaka Svjetske zdravstvene organizacije (21, 22, 27, 145, 146).

7.1 Opasnosti pri radu s organofosforinim insekticidima

Ekspoziciju organofosforinim insekticidima možemo podijeliti u 4 velike grupe: (1) profesionalna ekspozicija (tvornički radnici, radnici koji vrše formuliranje preparata, zatim radnici koji primjenjuju insekticide i poljoprivredni radnici, izloženi ostacima insekticida na usjevima), (2) ekspozicija u stanovima (povremena ekspozicija kod primjene sredstava za tamanjenje insekata), (3) ekspozicija zbog nesretnog slučaja (ingestija otrova, prosipavanje otrova i t. d.) i (4) ekspozicija zagađenoj hrani (konsumiranje hrane, koja sadržava ostatke insekticida).

Od najvećeg je značenja profesionalna ekspozicija i ona je naročito opasna kad se uvodi primjena novih insekticida. Razlikujemo opasnosti, koje nastaju pri proizvodnji, i opasnosti, koje se javljaju pri samoj primjeni insekticida. Opasnosti pri proizvodnji dijelimo dalje u one, koje nastaju pri proizvodnji osnovne aktivne sastavine i one, koje nastaju pri formuliranju aktivnih sastavina u preparate prikladne za terensku upotrebu. U pravilu, proizvodnja aktivne sastavine vrši se u velikim kemijskim tvornicama, dobro osposobljenima za taj posao. Postupak je mehaniziran i više manje automatiziran i stoga je opasnost po zdravlje radnika, koji rade u takvim poduzećima, relativno malena. S druge strane, formuliranje aktivne sastavine obično se vrši u malim poduzećima, od kojih mnoga nemaju prikladna tehnička postrojenja za taj posao. Opasnost za radnike, koji rade u takvim poduzećima, mnogo je veća zbog primitivnog postupka i niskog industrijsko-higijenskog standarda poduzeća (21).

Kod primjene organofosforinim insekticida najveće toksikološko značenje predstavlja rukovanje koncentriranim preparatima (145), pri čemu neodstranjene mrlje otrova na koži (najčešće na rukama) predstavljaju najveću pogibelj. Udisavanje sitnih kapljica ili prašine za vrijeme primjene organofosforinim insekticida na otvorenom, čini se da je od znatno manjeg značenja od kontaminacije kože, koja je prema nalazima američkih autora (28 i 42) najvažniji put apsorpcije otrova za vrijeme nje-

gove terenske primjene. Katkada može doći do ingestije otrova zbog ispunjavanja ili isisavanja začepljene sapnice na uređaju za prskanje ili zbog uzimanja zagađene vode ili hrane. Zagađenje očiju može izazvati lokalno djelovanje (mioza), ali je opasnost od otrovanja tim putem vrlo mala (56). Koncentracija para pri upotrebi organofosfornih insekticida na otvorenom rijetko je tolika, da bi bila od toksikološkog značenja.

Edson (57) dijeli poljoprivredne insekticide u tri skupine s obzirom na njihovu akutnu toksičnost za sisavce i opasnost za zdravlje pri njihovoj primjeni. Malathion svrstava u grupu »relativno bezopasnih pesticida«, Diazinon, Dipterex i Metasystox u grupu »umjereno opasnih spojeva«, dok je Parathion, TEPP, Sulphotepp, Schradan, Systox i Dimetox svrstao u grupu »izrazito opasnih spojeva«. Opasnosti, međutim, ne zavise samo od prirode otrova, već i od prikladnosti naprava za pripremanje otopina i aplikaciju, od opreza i čistoće radnika, kao i od trajanja ekspozicije. Vrijeme najintenzivnije upotrebe organofosfornih insekticida na terenu, a prema tome i opasnosti, seže od početka travnja do rujna, s maksimumom u mjesecu svibnju, lipnju i srpnju.

7.2 Zaštita

Zaštitne mjere, koje treba provesti pri proizvodnji organofosfornih insekticida, u principu su jednake higijensko-tehničkim mjerama, koje vrijede za ostalu kemijsku industriju. Važno je upozoriti radnike da oprezno rukuju i striktno se pridržavaju općih i ličnih zaštitnih mjera. Sanitarni uređaji, koji će omogućiti radnicima pranje ruku u prekidu posla, kao i duširanje na kraju radnog vremena, vrlo je važno. Dalje je potrebno osigurati brzo pružanje prve pomoći za slučajeve otrovanja zbog nesreće.

Kako bi se izbjegle zabune ili pogrešna rukovanja organofosfornim pesticidima, svaki komercijalni preparat treba biti obojen intenzivnom bojom, zatim treba da bude jasno označen kao otrov i na naljepnici treba navesti ove podatke (146):

- (a) ime proizvođača,
- (b) ime preparata,
- (c) vrstu pripravka i koncentraciju aktivne sastavine,
- (d) gdje se primjena toga sredstva preporučuje, a gdje ne,
- (e) osnovne mjere opreza, koje treba primijeniti pri aplikaciji,
- (f) zgodnu oznaku za opasnost, a za izrazito otrovne supstancije i slikoviti simbol opasnosti (lubanja s ukrštenim kostima) i
- (g) terapiju za slučaj otrovanja.

Kod primjene relativno bezopasnih organofosfornih spojeva (Malathion i Chlorthion) u javnom zdravstvu ili poljoprivredi, treba primijeniti općenite higijensko-tehničke mjere, od kojih treba istaći ove: radnici treba da pokrivaju glavu zaštitnom kapom iz nepropusnog materijala.

jala, koju treba redovno čistiti. Treba omogućiti pranje ruku i odjeće za slučaj polijevanja ili zaprskavanja. Radnici ne smiju pušiti ni jesti, a da prije ne operu ruke. Presipavanje, odnosno prelijevanje koncentrata treba izvoditi polumehaniziranim postupkom, odnosno specijalnim zgodnim oblikom posuda (145). Radi li se o primjeni tih spojeva u zatvorenom prostoru, radnik treba da je zaštićen kapom sa štitnikom širine oko 8 cm, nepropusnim štitnicima za ramena kao i nepropusnim rukavicama, otpornim prema kemikalijama. Redovno pranje, duširanje i čišćenje odjeće, a isto tako i strogo pridržavanje radnog vremena, koje ne smije prijeći 8 sati na dan, veoma je važno.

Za umjereno toksične spojeve (Diazinon) treba nositi respiratore, kad god se vrši prskanje u zatvorenom. Za vrlo toksične spojeve (Parathion, Systox, TEPP) prskanje u zatvorenom ne dolazi u obzir, a napolju treba naročitu pažnju obratiti ponavljanom pranju ruku i adekvatnoj zaštitnoj odjeći. Pri izboru respiratora treba podesiti vrstu respiratora prema tipu formulacije određenog otrova (146).

Prskanje organofosfornih pesticida iz aviona zahtijeva provođenje specijalnih mjera opreza (84). Utovarivanje pesticida ne smije vršiti pilot, da se izbjegne lična kontaminacija. Naročiti oprez je potreban s obzirom na čistoću, i zbog toga piloti treba da nose bijele kombinezone. Treba koristiti samo avione konstruirane za tu svrhu, kako bi se svela kontaminacija avionskog trupa na minimum. Pilot ne smije letjeti kroz maglu pesticida, koju je proizveo.

Od nadasve velikog je značenja medicinska kontrola radnika i redovno određivanje stepena ekspozicije pomoću prikladne metode za određivanje aktivnosti kolinesteraze u krvi (vidi 4.2). Budući da normalne vrijednosti variraju znatno među zdravim ljudima, a isto tako postoje znatne varijacije kod jedne iste osobe iz dana u dan (62, 64, 144), interpretacija pojedinačnih vrijednosti kod osoba, koje ne pokazuju simptome, je vrlo teška. Međutim, izražena niska aktivnost kolinesteraze kod pojedinca, ili relativno nizak prosjek aktivnosti kolinesteraze za grupu eksponiranih radnika ukazuje na potrebu poboljšanja zaštitnih mjera. Prema Gageu (64) individualne varijacije mogu varirati i za 30% od srednje normalne vrijednosti; utvrdi li se međutim pad aktivnosti kolinesteraze za preko 30% od srednje normalne vrijednosti, možemo sa sigurnošću zaključiti da je došlo do opasne apsorpcije otrova.

Osnovno je organizirati redovno određivanje aktivnosti kolinesteraze u krvi svuda, gdje je grupa ljudi eksponirana organofosfornim insekticidima kroz duži period vremena. *Wolfsie* (143) ističe, da se kontrola eksponiranih radnika ne smije ograničiti samo na određivanje aktivnosti kolinesteraze u krvi, već treba provesti i sve ostale industrijsko-higijenske zaštitne mjere. Isti autor savjetuje, da se pri rutinskom ocjenjivanju ekspozicije određuje aktivnost obiju kolinesteraza u krvi, t. j. odvojeno aktivnost kolinesteraze eritrocita i aktivnost kolinesteraze seruma.

Pri radu s Parathionom može se za ocjenu ekspozicije koristiti određivanje paranitrofenola u urinu. *Waldman* i suradnici (134) savjetuju određivanje aktivnosti kolinesteraze prije početka rada, a zatim, dok traje ekspozicija, treba danomice pratiti izlučivanje paranitrofenola u mokraći. Utvrđi li se porast izlučivanja paranitrofenola, treba nalaz povećane apsorpcije otrova potvrditi ponovnim određivanjem aktivnosti kolinesteraze u krvi.

Opasnosti, koje određeni, a napose organofosforni pesticidi predstavljaju za zdravlje radnika, bilo pri njihovoj proizvodnji ili primjeni, mogu se u velikoj mjeri smanjiti adekvatnim mjerama zaštite i dobro organiziranim medicinskom kontrolom eksponiranih radnika. Pesticidi su od neprocjenjivog značenja za javno zdravstvo i za razvitak poljoprivrede. Širenje njihove opravdane primjene zavisit će u prvom redu od uspješno provedenih mjera zaštite i prevencije otrovanja eksponiranih ljudi.

Literatura

1. *Aldridge, W. N.*: Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl *p*-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues, *Biochem. J.*, **46** (1950) 451.
2. *Aldridge, W. N.*: Serum Esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing *p*-nitrophenyl acetate, propionate and butirate, and a method for their determination, *Biochem. J.*, **53** (1953) 110.
3. *Aldridge, W. N.*: Serum Esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl *p*-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera, *Biochem. J.*, **53** (1953) 117.
4. *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.
5. *Aldridge, W. N.*: Anticholinesterases. Inhibition of cholinesterase by organophosphorus compounds and reversal of this reaction: mechanism involved, *Chem. and Ind.*, (1954) 473.
6. *Aldridge, W. N.*: Organophosphorus compounds and esterases. *Ann. Reports*, **53** (1957) 294.
7. *Aldridge, W. N.* i *Barnes, J. M.*: Some problems in assesing the toxicity of the 'organophosphorus' insecticides towards mammals, *Nature*, **169** (1952) 354.
8. *Aldridge, W. N.* i *Davison, A. N.*: The inhibition of erythrocyte cholinesterase by tri-esters of phosphoric acid, *Biochem. J.*, **51** (1952) 62.
9. *Aldridge, W. N.* i *Davison, A. N.*: The mechanism of inhibition of cholinesterases by organo-phosphorus compounds, *Biochem. J.*, **55** (1953) 763.
10. *Ashbolt, R. F.* i *Rydon, H. N.*: The reactivation of di-isopropyl fluorophosphate with tyrosine, *J. Amer. Chem. Soc.*, **74** (1952) 1865.
11. *Askew, Beryl M.*: Oximes and hydroxamic acids as antidotes in anticholinesterase poisoning, *Brit. J. Pharmacol.*, **11** (1956) 417.
12. *Askew, Beryl M.*: Oximes and atropine in sarin poisoning, *Brit. J. Pharmacol.*, **12** (1957) 340.
13. *Askew, Beryl M.*, *Davies, D. R.* i *Green, A. L.*: Factors influencing the effect of oximes on organophosphate poisoned animals, *Biochem. J.*, **66** (1957) 43P.
14. *Askew, Beryl M.*, *Davies, D. R.*, *Green, A. L.* i *Holmes R.*: The nature of the toxicity of 2-oxo-oximes, *Brit. J. Pharmacol.*, **11** (1956) 424.
15. *Augustinsson, K. B.*: Substrate concentration and specificity of choline ester-splitting enzymes, *Arch. Biochem.*, **23** (1949) 111.

16. *Augustinsson, K. B.*: The normal variation of human blood cholinesterase activity, *Acta Physiol. Scand.*, **35** (1955) 40.
17. *Augustinsson, K. B.* i *Heimbürger, G.*: Enzymatic hydrolysis of organophosphorous compounds. IV. Specificity studies, *Acta Chem. Scand.*, **8** (1954) 1533.
18. *Augustinsson, K. B.* i *Heimbürger, G.*: Enzymatic hydrolysis of organophosphorous compounds. V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactivation of cholinesterases by organophosphorous compounds *in vitro*, *Acta Chem. Scand.*, **9** (1955) 310.
19. *Balls, A. K.* i *Jansen, E. F.*: Stoichiometric inhibition of chymotrypsin, *Adv. Enzymol.*, **13** (1952) 321.
20. *Barnes, J. M.*: The reactions of rabbits to poisoning by *p*-nitrophenyldiethylphosphate (E600), *Brit. J. Pharmacol.* **8** (1953) 208.
21. *Barnes, J. M.*: Toxic hazards of certain pesticides to man, World Health Organization: Monograph Series, No. 16, WHO, Geneva, 1953.
22. *Barnes, J. M.*: Control of health hazards associated with the use of pesticides objavljeno u *Advances in pest control research*, Volume 1, Interscience Publishers, Inc., New York, 1957.
23. *Barnes, J. M.* i *Denz, F. A.*: The chronic toxicity of *p*-nitrophenyl diethylthiophosphate (E 605); a long-term feeding experiment with rats, *J. Hyg., Lond.*, **49** (1951) 430.
24. *Barnes, J. M.* i *Denz, F. A.*: Experimental demyelination with organo-phosphorus compounds, *J. Path. Bact.*, **65** (1953) 597.
25. *Barnes, J. M.* i *Denz, F. A.*: The reaction of rats to diets containing octamethyl pyrophosphoramid (schradan) and *oo*-diethyl-*S*-ethylmercaptoethanol thiophosphate («systox»), *Brit. J. Indust. Med.*, **11** (1954) 11.
26. *Barnes, J. M.* i *Duff, J. I.*: Acetylcholine production in animals poisoned by diethyl-*p*-bitrophenyl phosphate (paraoxon), *Brit. J. Pharmacol.*, **9** (1954) 153.
27. *Barnes, J. M.*, *Hayes, W. J.* i *Kay, K.*: Control of health hazards likely to arise from the use of organo-phosphorus insecticides in vector control, *Bull. Wld Hlth Org.*, **16** (1957) 41.
28. *Batchelor, G. S.* i *Walker, K. C.*: Health hazards involved in the use of parathion in fruit orchards of north central Washington, *A. M. A. Arch. Indust. Hyg.*, **10** (1954) 522.
29. *Bethe, K.*, *Erdmann, W. D.*, *Lendle, L.* i *Schmidt, G.*: Spezifische Antidot-Behandlung bei protrahierter Vergiftung mit Alkylphosphaten (Paraoxon, Parathion, DFP) und Eserin an Meerschweinchen, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, **231** (1957) 3.
30. *Bidstrup, P. L.* i *Bonnell, J. A.*: Anticholinesterases. Paralysis in man following poisoning by cholinesterase inhibitors, *Chem. and Ind.*, **24**, (1954) 674.
31. *Bidstrup, P. L.*, *Bonnell, J. A.* i *Beckett, A. G.*: Paralysis following poisoning by a new organic phosphorus insecticide (mipafox): Report on two cases, *Brit. Med. J.*, **1** (1953) 1068.
32. *Bournsnell, J. C.* i *Webb, E. C.*: Reaction of esterases with radioactive fluorophosphanate, *Nature*, **164** (1949) 875.
33. *Brown, R. U.*, *Kunkel, A. M.*, *Somers, L. M.* i *Wills, J. H.*: Pyridine-2-aldoxime methiodide in the treatment of sarin and tabun poisoning with notes on its pharmacology, *J. Pharmacol.*, **120** (1957) 276.
34. *Bruce, R. B.*, *Howard, J. W.*, *Sauveur, A. B.* i *Hazleton, L. W.*: Toxicity studies on diazinon, 0,0-diethyl-0-(2-isopropyl-4-methyl-pyrimidil[6]) thiophosphate, *Fed. Proc.*, **13** (1954) 339.
35. *Burgen, A. S. U.*: The mechanism of action of anticholinesterase drugs, *Brit. J. Pharmacol.*, **4** (1949) 219.
36. *Callaway, S.*, *Davies, D. R.* i *Rutland, J. P.*: Blood cholinesterase levels and range of personal variation in a healthy adult population, *Brit. Med. J.*, **2** (1951) 812.

37. Candole, C. A. de, Douglas, W. W., Evans, C. L., Holmes, R., Spencer, K. E. U., Torrance, R. W. i Wilson, K. M.: The failure of respiration in death by anticholinesterase poisoning, Brit. J. Pharmacol., 8 (1953) 466.
38. Candole, C. A. de i McPhail, M. K.: Pentamethonium as an adjuvant to atropine in the therapy of paraoxon poisoning, Nature, 174 (1954) 552.
39. Cassida, J. E., Allen, T. C. i Stahmann, M. A.: Reaction of certain octamethylpyrophosphoramidate derivatives with chymotrypsin, J. Amer. Chem. Soc., 74 (1952) 5548.
40. Childs, A. F., Davies, D. R., Green, A. L. i Rutland, J. P.: The reactivation by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organo-phosphorus compounds, Brit. J. Pharmacol., 10 (1955) 462.
41. Cohen, J. A., Warringa, M. G. P. J. i Bovens, B. R.: Protection of true cholinesterase against diisopropylfluorophosphate by butyrylcholine, Biochim. Biophys. Acta, 6 (1951) 469.
42. Culver, D., Caplan, P. i Batchelor, G. S.: Studies of human exposure during aerosol application of malathion and chlorthion, A. M. A. Arch. Indust. Health, 13 (1956) 37.
43. David, W. A. L. i Aldridge, W. N.: The insecticidal material in leaves of plants growing in soil treated with parathion, Ann. Appl. Biol., 45 (1957) 332.
44. Davies, D. R. i Green, A. L.: General discussion, Discuss. Faraday Soc., 20 (1955) 269.
45. Davies, D. R. i Green, A. L.: The kinetics of reactivation, by oximes, of cholinesterase inhibited by organophosphorus compounds, Biochem. J., 63 (1956) 529.
46. Davison, A. N.: Return of cholinesterase activity in the rat after inhibition by organophosphorus compounds. 1. Diethyl *p*-nitrophenyl phosphate (E 600, Paraoxon), Biochem. J., 54 (1953) 583.
47. Davison, A. N.: The conversion of schradan (OMPA) and parathion into inhibitors of cholinesterase by mammalian liver, Biochem. J., 61 (1955) 203.
48. Diggle, W. M. i Gage, J. C.: Cholinesterase inhibition by parathion *in vivo*, Nature, 168 (1951) 998.
49. Dixon, E. M.: Dilatation of the pupils in parathion poisoning, J. Amer. Med. Assoc., 163 (1957) 444.
50. Dormal, S.: Les risques d'intoxication chronique inhérents à l'usage des produits phytopharmaceutiques en agriculture, J. Pharm. Belg., Nos 9-10 (1956) 426.
51. Douglas, W. W. i Paton, W. D. M.: The mode of action of tetraethylpyrophosphate at the cat's neuromuscular junction, J. Physiol., 115 (1951) 71P.
52. DuBois, K. P. i Coon, J. M.: Toxicology of organic phosphorus-containing insecticides to mammals, A. M. A. Arch. Indust. Hyg., 6 (1952) 9.
53. DuBois, K. P., Doull, J., Deroin, J. i Cummings, O. K.: Studies on the toxicity and mechanism of action of some new insecticidal thionophosphates, A. M. A. Arch. Indust. Hyg., 8 (1953) 350.
54. Dultz, L., Epstein, M. A., Freeman, G., Gray, E. H. i Weil, W. B.: Studies on a group of oximes as therapeutic compounds in sarin poisoning, J. Pharmacol., 119 (1957) 522.
55. Durham, W. F., Gaines, T. B. i Hayes, W. J.: Paralytic and related effects of certain organic phosphorus compounds, A. M. A. Arch. Indust. Health, 13 (1956) 326.
56. Edson, E. F.: Agricultural pesticides, Brit. Med. J., 1 (1955) 841.
57. Edson, E. F.: Health hazards to agricultural workers, Brit. J. Clin. Pract., 11 (1957) No. 7.
58. Fenwick, M. L., Barron, J. R. i Watson, W. A.: The conversion of dimefox into an anticholinesterase by rat liver *in vitro*, Biochem. J., 65 (1957) 58.
59. Frawley, J. P., Fuyat, H. N., Hagan, E. C., Blake, J. R. i Fitzhugh, O. G.: Marked potentiation in mammalian toxicity from simultaneous administration of two anticholinesterase compounds, J. Pharmacol., 121 (1957) 96.

60. *Frawley, J. P., Hagan, E. C. i Fitzhugh, O. G.*: A comparative pharmacological and toxicological study of organic phosphate - anticholinesterase compounds, *J. Pharmacol.*, *105* (1952) 156.
61. *Freeman, G. i Epstein, M. A.*: Therapeutic factors in survival after lethal cholinesterase inhibition by phosphorus insecticides, *New Engl. J. Med.*, *253* (1955) 266.
62. *Fryer, J. H., Steel, R. G. D. i Williams, H. H.*: Cholinesterase activity levels in normal human subjects. A statistical evaluation with reference to the detection of minimal absorption of the organic phosphate insecticides, *A. M. A. Arch. Indust. Health*, *12* (1955) 406.
63. *Fukuto, T. R., Metcalf, R. L., March, R. B. i Maxon, M. G.*: Chemical behaviour of systox isomers in biological systems, *J. Econ. Entomol.*, *48* (1955) 347.
64. *Gage, J. C.*: Blood cholinesterase values in early diagnosis of excessive exposure to phosphorus insecticides, *Brit. Med. J.*, *1* (1955) 1370.
65. *Gardiner, J. E.*: Biochemistry of organic phosphorus insecticides. 1. The mammalian metabolism of bis (dimethylamino) phosphorous anhydride (Schrader), *Biochem. J.*, *51* (1952) 78.
66. *Gassman, R.*: Über Vergiftungen mit Insektiziden vom Typus der Anticholinesterasen im Zeitraum von 1950-1956, *Praxis*, *46* (1957) 393-402, 416-424.
67. *Gordon, A. S. i Frye, C. W.*: Large doses of atropine. Low toxicity and effectiveness in anticholinesterase intoxication, *J. A. M. A.*, *159* (1955) 1181.
68. *Green, A. L. i Saville, B.*: The reactivation of oximes with isopropyl methylphosphono fluoride (sarin), *J. Chem. Soc.*, (1956) 3887.
69. *Green, A. L. i Smith, H. J.*: Complex formation in the reactivation of cholinesterase inhibited with organophosphate, *Biochem. J.*, *66* (1957) 42P.
70. *Green, A. L. i Smith, H. J.*: The reactivation of cholinesterase inhibited with organo-phosphorus compounds. 1. Reactivation by 2-oxoaldoximes, *Biochem. J.*, *68* (1958) 28.
71. *Green, A. L. i Smith, H. J.*: The reactivation of cholinesterase inhibited with organo-phosphorus compounds. 2. Reactivation by pyridine aldoximes methiodides, *Biochem. J.*, *68* (1958) 32.
72. *Grob, D.*: The manifestations and treatment of poisoning due to nerve gas and other organic phosphate anticholinesterase compounds, *A. M. A. Arch. Intern. Med.*, *98* (1956) 221.
73. *Hartley, B. S. i Kilby, B. A.*: Inhibition of chymotrypsin by diethyl *p*-nitrophenyl phosphate, *Nature*, *166* (1950) 784.
74. *Hartley, G. S.*: XVth International Chemical Congress, New York (1951), citra: Schrader, G. (125).
75. *Hazleton, L. W. i Holland, E. G.*: Toxicity of malathion. Summary of mammalian investigation, *A. M. A. Arch. Indust. Hyg.*, *8* (1953) 399.
76. *Heath, D. F., Park, P. O., Lickerish, L. A. i Edson, E. F.*: The composition of systox and the behaviour of this insecticide in the living plant, *Pest Control Ltd.* (Mimeo. report), 1953.
77. *Heath, D. F. i Vandekar, M.*: Some spontaneous reactions of *oo*-dimethyl *S*-ethyl-thioethyl phosphorothiolate and related compounds in water and on storage, and their effects on the toxicological properties of the compounds, *Biochem. J.*, *67* (1957) 187.
78. *Hobbiger, F.*: Inhibition of cholinesterases by irreversible inhibitors *in vitro* and *in vivo*, *Brit. J. Pharmacol.*, *6* (1951) 21.
79. *Hobbiger, F.*: The inhibition of cholinesterases by 3-(diethoxyphosphinyloxy)-*N*-methylquinolinium methyl sulphate and its tertiary base, *Brit. J. Pharmacol.*, *9* (1954) 159.
80. *Hobbiger, F.*: Effect of nicotinhydroxamic acid methiodide on human plasma cholinesterase inhibited by organophosphates containing a dialkylphosphato group, *Brit. J. Pharmacol.*, *10* (1955) 356.
81. *Hobbiger, F.*: Chemical reactivation of phosphorylated human and bovine true cholinesterases, *Brit. J. Pharmacol.*, *11* (1956) 295.

82. *Hobbiger, F.*: Protection against the lethal effects of organophosphate by pyridine-2-aldoxime methiodide, *Brit. J. Pharmacol.*, *12* (1957) 438.
83. *Hunter, D., Perry, K. M. A. i Evans, R. B.*: Toxic polineuritis arising during the manufacture of tricresyl phosphate, *Brit. J. Indust. Med.*, *1* (1944) 227.
84. *Ingram, F. R.*: Health hazards associated with use of airplanes for dusting crops with parathion, *Amer. Indust. Hyg. Assoc. Quart.*, *12* (1951) 165.
85. *Jandorf, B. J., Michel, H. O., Schaffer, N. K., Egan, R. i Summerson, W. H.*: The mechanism of reaction between esterases and phosphorus-containing anti-esterases, *Discuss. Faraday Soc.*, *20* (1955) 134.
86. *Jansen, E. F., Fellowes-Nutting, M. D., Jang, R. i Balls, A. K.*: Mode of inhibition of chymotrypsin by diisopropylfluorophosphate. II. Introduction of isopropyl and elimination of fluorine as hydrogen fluoride, *J. Biol. Chem.*, *185* (1950) 209.
87. *Jansen, E. F., Jang, R. i Balls, A. K.*: The inhibition of purified, human plasma cholinesterase with diisopropyl fluorophosphate, *J. Biol. Chem.*, *196* (1952) 247.
88. *Kaess, H.*: Zur Bedeutung der Intubation und Sauerstoffbeatmung bei schwerer E 605-Vergiftung, *Ärztl. Wschr.*, *10* (1955) 1064.
89. *Kaufman, K.*: Serum cholinesterase activity in the normal individual and in people with liver disease, *Ann. Intern. Med.*, *41* (1954) 533.
90. *Kewitz, H. i Wilson, I. B.*: A specific antidote against lethal alkylphosphate intoxication, *Arch. Biochem. Biophys.*, *60* (1956) 261.
91. *Kilby, B. A.*: Biochemistry of Schradan, *Chem. and Ind.*, (1953) 856.
92. *Kilby, B. A. i Youatt, G.*: Reaction of trypsin with organic phosphate inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta*, *8* (1952) 112.
93. *Klučik, I.*: Histochemický preukaz účinnosti antidót proti anticholinesteratickým jedom, *Prac. lék.*, (1957) 496.
94. *Kodana, J. K., Anderson, H. H., Dunlap, M. K. i Hine, C. H.*: Toxicity of organophosphorus compounds. 1. Structure-action relationship in laboratory animals and man, *A. M. A. Arch. Indust. Health*, *11* (1953) 487.
95. *Koelle, G. B. i Gilman, A.*: Anticholinesterase drugs, *J. Pharmacol.*, *95* (1949) 166.
96. *Kubištová, J.*: Parathion metabolism in rat and kidney slices, *Experientia*, *12* (1956) 233.
97. *Lands, A. M.*: An investigation of the molecular configuration favorable for stimulation or blockade of the acetylcholine-sensitive receptors of visceral organs, *J. Pharmacol.*, *102* (1951) 219.
98. *Lewis, J. R., McKeon, W. B. Jr. i Lands, A. M.*: Effect of various drugs in antagonizing the toxicity of TEPP, *Arch. int. pharmacodyn.*, *102* (1955) 371.
99. *Lieben, J., Waldman, R. K. i Krause, L.*: Urinary excretion of paranitrophenol following exposure to parathion, *A. M. A. Arch. Indust. Hyg.*, *7* (1953) 93.
100. *Lieben, J., Waldman, R. K. i Krause, L.*: Urinary excretion of paranitrophenol following exposure to parathion, *A. M. A. Arch. Indust. Hyg.*, *7* (1953) 93.
101. *Loomis, T. A.*: The effect of an aldoxime on acute sarin poisoning, *J. Pharmacol.*, *118* (1956) 123.
102. *Mattson, A. M., Spillane, J. T. i Pearce, G. W.*: Dimethyl 2,2-dichlorovinyl phosphate (DDVP), an organic phosphorus compound highly toxic to insects, *J. Agric. Food Chem.*, *3* (1955) 319.
103. *Metcalf, R. L.*: Organic insecticides. The chemistry and mode of action, Interscience Publishers, Inc., New York, 1955.
104. *Michel, H. O.*: An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity, *J. Lab. and Clin. Med.*, *34* (1949) 1564.
105. *Michel, H. O.*: American society of biological chemists, forty-third annual meeting, New York City, April 14-18, 1952, *Fed. Proc.*, *11* (1952) 259.
106. *Michel, H. O. i Krop, S.*: The reaction of cholinesterase with diisopropyl fluorophosphate, *J. Biol. Chem.*, *190* (1951) 119.

107. Mühlmann, R. i Tietz, H.: The chemical behaviour of methylisoxystox in the living plant and the problem of residues, Höfchen-Briefe, No. 2 (1956).
108. Myers, D. K.: Studies on selective esterase inhibitors, Dizertacija, Sveučilište Amsterdam, 1954.
109. Nachmansohn, D.: Chemical mechanisms of nerve activity, u Modern trends in physiology and biochemistry, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1952, str. 229.
110. Nachmansohn, D. i Wilson, I. B.: The enzymatic hydrolysis and synthesis of acetylcholine, Adv. Enzymol., 12 (1951) 259.
111. Namba, T.: Causal therapy of alkylphosphate poisoning, u štampi, citira: Bethe, K., et al. (29).
112. O'Brien, R. D.: Activation of schradan by mammalian tissue homogenates, Canad. J. Biochem. Physiol., 34 (1956) 1131.
113. O'Brien, R. D.: The mechanism of schradan activation by liver microsomes, Canad. J. Biochem. Physiol. 35 (1957) 45.
114. Osterbaan, R. A., Kunst, P. i Cohen, J. A.: The nature of the reaction between diisopropylfluorophosphate and chymotrypsin, Biochim. Biophys. Acta, 16 (1955) 299.
115. Parkes, M. W. i Sacra, P.: Protection against the toxicity of cholinesterase inhibitors by acetylcholine antagonists, Brit. J. Pharmacol., 9 (1954) 299.
116. Pribilla, O.: Vergiftungen mit E 605 (0,0-Diäthyl-0,p-nitrophenyl-thiophosphorsäureester). Sammelbericht über die bis 1.1.55 publizierten und 10 eigene Todesfälle sowie über die theoretischen Grundlagen der Vergiftung und der Nachweismethoden, Arch. Toxikol., 15 (1954) 210.
117. Reiner, Elsa: Kolinesteraze. Biokemijske karakteristike i metode odredivanja aktivnosti, Arh. hig. rada, 9 (1958).
118. Reiner, Elsa, Svetličić, B. i Vandekar, M.: Effects of some oximes in diethyl p-nitrophenyl (parathion) poisoning, Proc. XIIth International Congress on Occupational Health, Helsinki, 1.-6. 7. 1957, Vol. III, str. 233.
119. Ripper, W. E.: Systemic insecticides, IIIrd International Congress of Crop Protection, Paris, 1952.
120. Rosenblueth, A.: Transmission of nerve impulses at neuroeffector junction and peripheral synapses, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1950.
121. Rutland, J. P. The *in vivo* effects of some oximes in sarin poisoning, Biochem. J., 66 (1957) 43P.
122. Sanderson, G. M.: Assessment of direct cholinesterase inhibitory activity by pupillary miosis, J. Pharm. Pharmacol., 9 (1957) 600.
123. Schaffer, N. K., May, S. C. i Summerson, W. H.: Serine phosphoric acid from diisopropylphosphoryl chymotrypsin, J. Biol. Chem., 202 (1953) 67.
124. Schrader, G.: Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphorverbindungen, Monographie Nr. 62, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, 1952.
125. Schrader, G.: Organische Phosphorsäure- und Thiophosphorsäureester als neue Wirksubstanzen in der Human- und Veterinär-Medizin und im Hygiene-Sektor, Medizin u. Chemie, Band V., str. 496, Verlag Chemie, Weinheim, 1956.
126. Stewart, W. C.: Accumulation of acetylcholine in brain and blood of animals poisoned with cholinesterase inhibitors, Brit. J. Pharmacol., 7 (1952) 270.
127. Svetličić, B. i Vandekar, M.: Faktori koji uvjetuju varijabilnost rezultata pri ocjeni akutne toksičnosti, Arh. hig. rada, 9 (1958).
128. United States Department of Health, Education and Welfare, Communicable Disease Center: Clinical memoranda on economic poisons, Savannah, Ga., 1956.
129. Vandekar, M.: The effect of the persistence of the inhibitor on the rate of the return of cholinesterase activity *in vivo* after injection with different dimethyl phosphate esters, Biochem. J., 65 (1957) 1P.

130. *Vandekar, M.*: The persistence of the inhibitor in the body after injection with some organo-phosphorus compounds, Proc. XIIIth International Congress on Occupational Health, Helsinki, 1.-6. 7. 1957, Vol. III, str. 232.
131. *Vandekar, M.* i *Heath, D. F.*: The reactivation of cholinesterase after inhibition *in vivo* by some dimethyl phosphate esters, *Biochem. J.*, 67 (1957) 202.
132. *Wagner-Jauregg, T.*, *O'Neill, J. J.* i *Summerson, W. H.*: The reaction of phosphorus-containing enzyme inhibitors with amines and amino acid derivatives, *J. Amer. Chem. Soc.*, 73 (1951) 5202.
133. *Wagner-Jauregg, T.* i *Hackley, B. E.*: Model reactions of phosphorus-containing enzyme inactivators. III. Interaction of amidazol, pyridine and some of their derivatives with dialkyl halogeno-phosphates, *J. Amer. Chem. Soc.*, 75 (1953) 2125.
134. *Waldman, R. K.*, *Lieben, J.* i *Krause, L.*: Physiological responses to parathion exposure. Correlation between serum cholinesterase activity and urinary parathion excretion, *A. M. A. Arch. Indust. Hyg.*, 9 (1954) 37.
135. *Weil, L.*, *James, S.* i *Buchert, A. R.*: Photooxidation of crystalline chymotrypsin in the presence of methylene blue, *Arch. Biochem. Biophys.*, 46 (1953) 266.
136. *Wilson, I. B.*: Acetylcholinesterase: XI. Reversibility of tetraethyl pyrophosphate inhibition, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 111.
137. *Wilson, I. B.*: Acetylcholinesterase: XIII. Reactivation of alkyl phosphate - inhibited enzyme, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 113.
138. *Wilson, I. B.*: The mechanism of enzyme hydrolysis studied with acetylcholinesterase, u The mechanism of enzyme action, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954, str. 642.
139. *Wilson, I. B.*: Promotion of acetylcholinesterase activity by the anionic site, *Discuss. Faraday Soc.*, 26 (1955) 119.
140. *Wilson, I. B.* i *Bergmann, F.*: Acetylcholinesterase: VIII. Dissociation constants of the active groups, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 683.
141. *Wilson, I. B.* i *Ginsburg, S.*: Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphates, *Arch. Biochem. Biophys.*, 54 (1955) 569.
142. *Wilson, I. B.* i *Ginsburg, S.*: A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 168.
143. *Wolfsie, J. H.*: Blood cholinesterase activity. Practical consideration in routine testing programs, *A. M. A. Arch. Indust. Health*, 16 (1957) 403.
144. *Wolfsie, J. H.* i *Winter, G. D.*: Statistical analysis of normal human red blood cell and plasma cholinesterase activity values, *A. M. A. Arch. Indust. Hyg.*, 6 (1952) 43.
145. World Health Organization, Expert Committee on Insecticides, *Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser. 110*, Geneva, 1956.
146. World Health Organization, Study group on the toxic hazards of pesticides to man: Toxic hazards of pesticides to man, report of a study group, *Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser. 114*, Geneva, 1956.

Summary

TOXICOLOGY OF ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES

A review of the biochemistry, pharmacology, experimental and clinical toxicology, therapy, and prevention of poisonings due to organophosphorus insecticides. The present-day concepts of the mechanism of the effect of organophosphorus inhibitors on cholinesterase are described more in detail, as well as the investigations in the field of the reactivation of inhibited cholinesterase by nucleophilic reagents.

*Institute for Medical Research,
Zagreb*

*Received for publication
April 20, 1958*