

Dr. Máté László, mérnök alezredes, dr. Wolf Imre, Szalai Csaba, dr. Töröcsik András

Egy új kolinolitikus vegyület kolineszteráz-bénító mérgeзések kezelésére

Kulcsszavak: kolinolitikumok, kolineszteráz-bénítók, atropin, H-1199, szomán

Erkezett: 1990. 11. 10.

A szerzők vizsgálták egy új kolinolitikus vegyületnek, az N-1199 kódjelű glikolát-észternek néhány in vitro tulajdonságát (pl: pA₂, receptorkötés stb.) és Vx, valamint szomán mérgezésben védő hatását. Megállapították, hogy in vitro kolinolitikus tulajdonságai valamivel elmaradnak az atropin tulajdonságaitól, kolineszteráz-bénító (Vx, szomán) mérgezésben viszont lényegesen hatékonyabb, mint az atropin.

A mérgező harcanyagok legtoxikusabb csoportját képező idegbénító hatású vegyületek a foszforvas-észterek (OF) csoportjába tartoznak. E vegyületcsoport elsődleges támadáspontja az élő szervezetben az acetilkolineszteráz enzim (AChE), amely a neurotranszmisszió szabályozásában játszik szerepet. Az OF-mérgezésnek talán legsúlyosabb következménye az enzim bénulását követő endogén acetilkolin mérgezés, amely több mechanizmuson keresztül az életet is veszélyezteti. Az acetilkolin felhalmozódása okozza elsősorban az akut hatásokat azokon a helyeken, amelyekeken mint neuro-transzmitter szerepel; így a posztganglionaris paraszimpatikus végződéseken (muszkarinszerű receptorok), a ganglionokban és a neuromuszkuláris kapcsolatokban (nikotinszerű receptorok) és a központi idegrendszerben (muszkarin- és nikotinszerű receptorok). A súlyos mérgeзést követő halál oka elsősorban a légzés elégtelenségére vezethető vissza, részben a bronchus görcsök és fokozott bronchus szekréció miatt (muszkarin hatás), a légző izmok bénulása (nikotinszerű hatás) és a légző központ bénulása (centrális hatás) miatt. A terápiás beavatkozás részben a bénított enzim aktivitásának helyreállítására, részben az acetil-kolin (ACh) túlsúly kivédésére irányul mind a periférián, mind a központi idegrendszerben. Az utóbbi célra alkalmazott kolinolitikumok mérsékelik a muszkarinszerű tüneteket — kémiai szerkezetüktől függően — a központi idegrendszerben és/vagy

a periférián, de nincs vagy csak csekély a hatásuk a nikotinszerű recepto-
rokon (1).

A ma legelterjedtebben alkalmazott kolinolitikum az atropin, amely azon-
ban nem minden tekintetben felel meg a követelményeknek, ezért újabb, haté-
konyabb vegyületek felkutatása széles körben folyik.

A vonatkozó publikációkban eltérőek az álláspontok annak megítélésében,
hogy a centrális vagy a perifériás hatású kolinolitikumok a hatékonyabb anti-
dotumok.

Tapasztalataink szerint a centrális hatású kolinolitikumok hatásosabbak. A
tapasztalatok azonban azt is mutatták, hogy a fokozott centrális védőhatás
mellett fokozottabb centrális inkapacitáló hatás is fellép, amennyiben a centrá-
lisan aktív vegyületek pszichotomimetikumok is, nem kívánt mellékhatást vál-
tanak ki (2).

Nádor 1968-ban előállított egy glikolsav-észtert (N-1199), amely az előze-
tes farmakológiai vizsgálatok szerint a periférián lényegesen gyengébb volt
(4-15%-a az atropin aktivitásának), míg a centrális hatásokban (antioxotre-
morin, anti-arecolin) felülmúlta az atropin centrális hatását anélkül, hogy
pszichotomimetikus hatást fejtene ki (3). Nem volt azonban ismert a terápiás
hatása antikolinészteráz mérgezésben, de a pontos térszerkezete és az akkori
preparátumban a sztereoizomerek aránya is ismeretlen volt.

Egy ilyen típusú centrálisan aktív kolinolitikus vegyület, amely nem rendel-
kezik pszichotomimetikus inkapacitáló hatással, ideális antidotumnak tűnik,
ezért az említett vegyületeket részletes vizsgálatnak vetettük alá. Vizsgálata-
inkban azokra a kérdésekre kerestük a választ, hogy milyen védőhatással ren-
delkezik antikolinészteráz mérgezésben, mi az optimális terápiás dózis, milyen
a hatás időprofilja, a sztereoizomerek közül melyik a hatásos és az egyes, a
kolinolitikus hatásra jellemző paraméterek mutatnak-e összefüggést a védőha-
tással. Közleményünkben ezekről az eredményekről számolunk be.

Anyagok

Kísérleteinkben LATI származású CELP törzszű, 20-25 g súlyú nőstény egereket,
CFY törzszű 160-299 g súlyú hím patkányokat, valamint saját tenyésztű, vegyes-
nemű tengerimalacokat használtunk:

Az alkalmazott vegyületek:

- atropin szulfát (Ph. Hg. VIII)
- benactylin (EGIS)
- dexetimid (Tremblex, Janssen)
- diazepam (KGy)
- 2-PAM.Cl (Bosnalijek, Sarajevo)
- oxotremorin-sesquifumarat (LOBA-Chemie)
- ³H-quinuclidinil-banzilát (QNB) (Amersham): spec. akt. 1,155.10¹² Bq/mmol
- HI-6 (piridinium-1-) (4-karbonil piridinio) metoxi(metil)-
- 2-(hidroxiiminometil)diklorid (prof. Nádor)
- szomán (pinakolil-metilfoszfono-fluoridát)
- Vx (O-etil S-2-diizopropil aminoetil metilfoszfonotiolát)
- N-1199 (2-dimetilamino-biciklo) (3.3.1.) nonán-9-01-benzilát (prof. Nádor)
- ³H-kolinklorid (Amersham) spec. akt.: 2,9.10¹² Bq/mmol

Az N-1199 szintézise során négy sztereoizomer képződhet. A gyakorlatban azonban
csak három alakul ki. A szerkezet leírása úgy történik, hogy gyűrűn lévő szubsztí-
tuensek helyzetét adjuk meg a gyűrű síkjához viszonyítva. A 2-es szénatomon lévő
-N(-CH₃)₂, valamint a 9-es szénatomon lévő -OH csoportok ha a gyűrű síkja
felett vannak α-val, ha a gyűrű síkja alatt vannak β-val jelöljük (a vegyértékvonala
szaggatottan ábrázolva).

A vegyületek összetételének és szerkezetének igazolása elemanalízissel (CNH), infravörös spektroszkópiával (IR) és proton mágneses rezonanciával (NMR) történt.

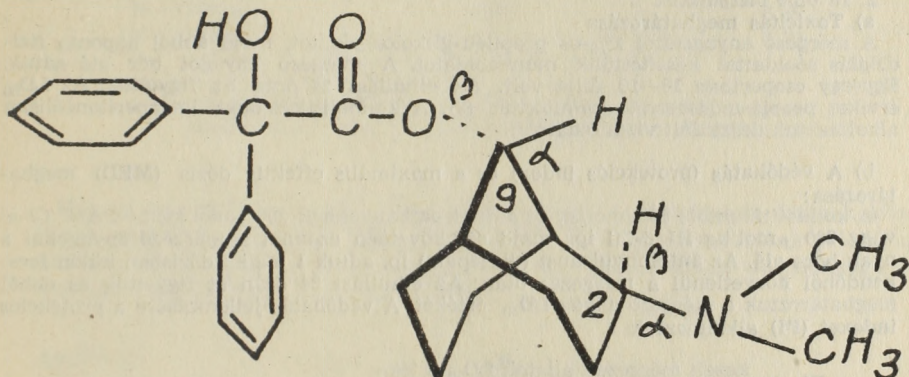
A továbbiakban az izomerek jelölésére az alábbi kódszámokat vezettük be:

2 α 9 β = N-1199/a

2 α 9 α = N-1199/b

2 β 9 α = N-1199/c

Az egyik sztereoizomer, a 2 α 9 β szerkezetét az 1. ábra mutatja.



1. ábra: A 2-dimetil-amino-biciklo [3.3.1] nonan-9-01-benzilát 2 α 9 β sztereo izomerjének (N-1199/a) szerkezete

A termékek sósavas só formában kerülnek kikristályosításra, amelynek mol tömege 429,97

Módszerek

1. Kolinolitikus hatás vizsgálata

a) Egyesületi állandó (pA_2) meghatározása tengerimalac ileum longitudinális izmán

A Schild (4) által leírt módszerrel, oxotremorint „egyszeri dózis” módszerrel alkalmazva 10^{-8} – 10^{-5} mol/l dózisban, 5–5 párhuzamos mérésrel. A pA_2 értékét Arunlakshana és Schild (5) által leírt módon számítottuk.

b) Receptor kötési vizsgálatok 3H -QNB-vel

A pH 7,4 foszfát pufferben homogenizált patkányagy striátumot (corpus striatum), amely 220–250 $\mu g/ml$ fehérjét tartalmaz (6) a vizsgált kolinolitikummal és 3H -QNB-vel 60 percig inkubáltuk. A homogenátot Whatman GF/C szűrőn szűrtük, szárítottuk és aktivitását Beckman LS 6800 típusú folyadék-scintillációs készüléken mértük. A nem-specifikus kötést 1 $\mu mol/l$ atropin jelenlétében határoztuk meg. A K_D disszociációs állandó értékét a Bennett által leírt módszerrel határoztuk meg (7).

c) Acetil-kolin (ACh) felszabadulás vizsgálata

A karbogén gázzal telített, 3H -kolin-kloridot tartalmazó Krebs-oldatban szervedényben felfüggesztve 45 percig inkubáltuk a tengerimalac ileum longitudinális izmát, miközben folyamatosan elektromos mező ingerlést alkalmaztunk szupramaximális négyszög impulzusokkal (10 V/cm, 1 ms, 0,3 Hz). Ezután 10^{-6} mol/l hemikolinium-3-at tartalmazó Krebs-oldattal perfundáltuk. (1 ml/perc/1 órán át, majd 3 percnként a perfúziós oldatot felfogtuk.) Ezekből 1 ml-es mintákat vettünk, melyeknek meghatároztuk radioaktivitását folyadék-scintillációs mérőberendezésen.

A mérés során két sorozat elektromos impulzust alkalmaztunk az ACh felszabadulás kiváltására (10 V/cm, 1 ms, 2 Hz 90 sec-ig) a kolinolitikum hozzáadása előtt és után. A kolinolitikum hozzáadása előtt gyűjtött frakciók aktivitásának összege (S1) szolgál viszonyítási értéként annak meghatározására, hogy a kolinolitikumok hogyan befolyásolják az ACh felszabadulást (S2). Az S2/S1 értékét a kontrollmérésekben (kolinolitikum nélkül) kapott S2/S1-értékhez viszonyítva kapjuk, hogy ehhez viszonyítva a kolinolitikum hogyan befolyásolja a preszinpatikus receptoron az ACh felszabadulást (8).

2. In vivo vizsgálatok

a) Toxicitás meghatározása

A mérgező anyagokból 1⁰/₀-os propilén-glikolos oldatot, majd abból naponta fiziológiai sóoldattal készítettünk munkaoldatot. A mérgező anyagot bőr alá adtuk. Egy-egy csoportban 10–10 állat volt. Az elhullást 24 órán át figyeltük. Az LD₅₀ értéket probit módszerrel számítottuk (9). A kolinolitikumokat intraperitoneálisan alkalmaztuk desztillált vizes oldatban.

b) A védőhatás (protektív index) és a maximális effektív dózis (MED) meghatározása:

A kolinolitikumból 20 μ mol/kg-ot adtunk patkányoknak 200 μ mol/kg 2—PAM. Cl-al vagy 200 μ mol/kg HI 6-tal ip., majd ezt követően azonnal a mérgező anyagokat a nyak bőre alá. Az antikonvulzánst (diazepam) ip. adtuk 1 mg/kg dózisban külön fecskendőből közvetlenül a mérgezés után. Az elhullást 24 órán át figyeltük és ebből meghatároztuk a mérgező anyag LD₅₀ értékét. A védőhatás jellemzésére a protektív indexet (PI) alkalmaztuk

$$PI = \frac{\text{kezelt mérgezett állatok LD}_{50} \text{ értéke}}{\text{mérgezett állatok LD}_{50} \text{ értéke}}$$

A MED-érték meghatározását egereken végeztük. A 200 μ mol/kg 2—PAM-mal együtt adtuk a kolinolitikumot 5, 10, 20, 30 és 40 μ mol/kg dózisban ip. és Vx-szel mérgezve határoztuk meg a PI-értéket.

c) A védőhatás időprofiljának meghatározása

Egereken vizsgáltuk a PI-értéket úgy, hogy a Vx mérgezés előtt azonnal, illetve 7, 15, 60 és 120 perccel előbb adtuk a kolinolitikumot 20 μ mol/kg dózisban, majd a mérgezést megelőzően 1 perccel a 200 μ mol/kg 2—PAM-ot.

Eredmények

Az egyensúlyi állandó (pA₂) értékét tengerimalac ileum hosszanti izmán, az oxotremorin által kiváltott izom kontrakciókból, illetve annak kolinolitikumokkal történő gátlásából számítottuk. Elsőként meghatároztuk a kiváltható kontrakció a maximumának 50⁰/₀-ához szükséges oxotremorin koncentrációt a kolinolitikumok különböző koncentrációja mellett (0–1 μ mol/l). Az ebből le származtatott értékeket [lg (DR–1)] a kolinolitikum függvényének logaritmusában ábrázolva egy egyenest kapunk, amelynek az x értéke a y=0 helyen éppen a keresett pA₂ értéket adja (2. ábra). Az ábrázolt értékekből lineáris regressziószámítással határozzuk meg a függvény konstansokat (1. táblázat).

Az összefüggést leíró függvény:

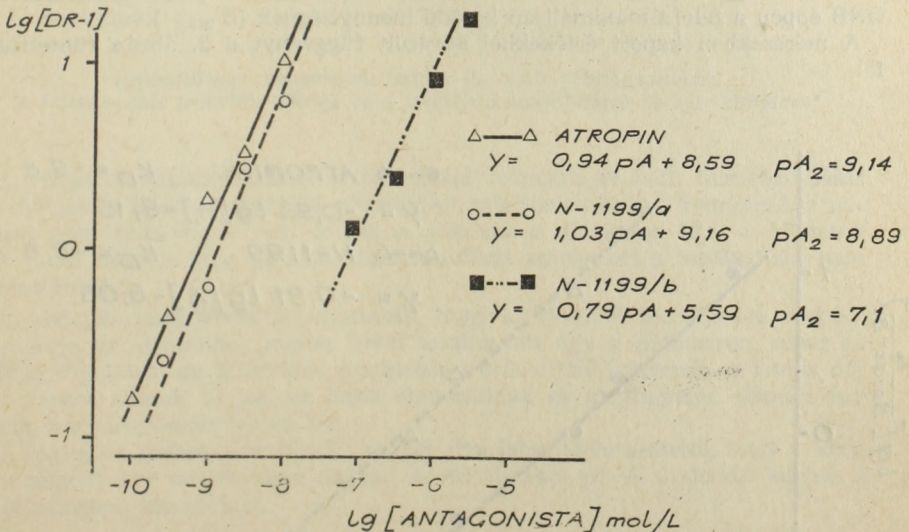
$$\lg (DR-1) = \lg K_2 - npA_2$$

1. táblázat

Antagonista	pA_2	Hill-szám (n)
atropin	0,94	9,14
N-1199/a	1,03	8,89
N-1199/b	0,79	7,10

Muszkarin antagonisták pA_2 és Hill-szám (n) értékei tengerimalac ileum hosszanti izmán oxotremorinnal vizsgálva

Míg az atropinra és az N-1199/a jelű sztereoizomerre kapott értékek közel állnak egymáshoz, az N-1199/b vegyület pA_2 és Hill-szám értékek jelentősen eltérnek ettől, jelezve, hogy ez utóbbi vegyület kolinolitikus tulajdonsága jelentősen eltér az előző két vegyületétől.



2. ábra: Az atropin, N-1199/a és N-1199/b sztereoizomerek antimuszkarin hatásvizsgálata során tengerimalac ileum longitudinális izmán kapott eredmények Schield ábrázolása
 Agonista: oxotremorin

A receptor kötési vizsgálatokban a tríciummal jelölt QNB-vel 60 percig inkubált agyhomogenáthoz kötött 3H -QNB aktivitása adja a receptorhoz (specifikus) és az azt kísérő fehérjékhez kötött (nem specifikus) QNB mennyisé-

gét. A receptorokat telítő $1 \mu\text{mol/l}$ atropin jelenlétében a QNB a nem specifikus helyekhez kötődik. Ennek értékét minden vizsgálatnál le kell vonni a mért aktivitásból, így megkapjuk a specifikusan (receptorhoz) kötött QNB értékét.

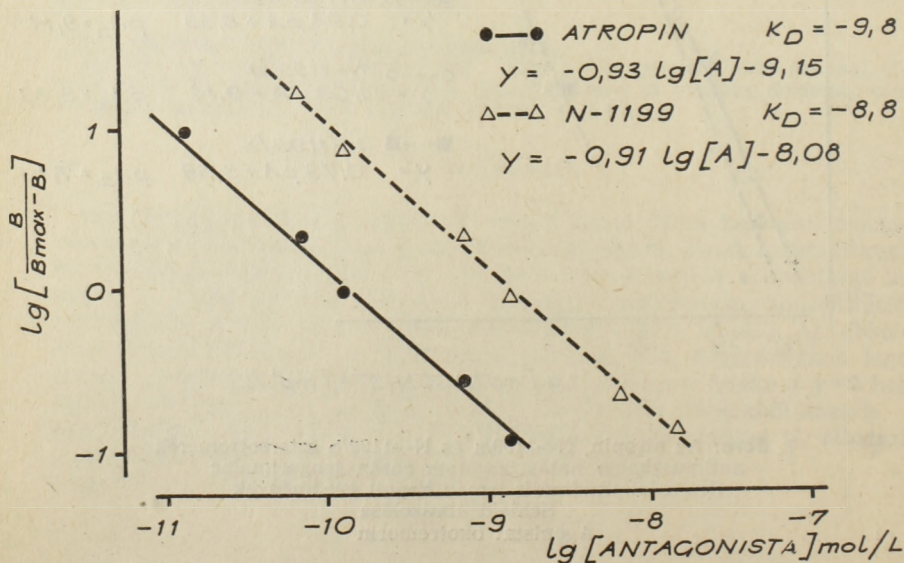
Az agyhomogénathoz hozzáadott vizsgált kolinolitikum koncentrációjától és a receptorhoz való affinitásától függően leszorítja a receptorról a QNB-t, így annak csak egy hányada kötődik a receptorhoz (B). A kolinolitikum nélkül mért specifikus kötés B_{max} és a különböző koncentrációjú kolinolitikum jelenlétében mért kötés (B) értékeiből képzett hányados logaritmusának értékét a kolinolitikum koncentráció [L] logaritmusának függvényében ábrázolva egyenest kapunk, amelynek x értéke az $y=0$ helyen éppen a keresett K_D értéket adja (3. ábra).

Ezt az összefüggést leíró egyenlet:

$$\lg \left[\frac{B}{B_{\text{max}} - B} \right] = n \lg [L] - \lg k_D$$

A fenti függvény bal oldala akkor 0, ha a kolinolitikum jelenlétében kötött QNB éppen a fele a maximálisan kötődő mennyiségnek (B_{max}).

A mérésekben kapott értékekkel ábrázolt függvényt a 3. ábrán tüntettük fel.



3. ábra: Az atropin és az N-1199 sztereoiszomer keverék disszociációs állandóinak (K_D) meghatározása ^3H -QNB patkány striátum muszkarin receptorhoz való kötődése alapján

A számításokból a disszociációs állandó értéke az atropinra 9,8-nak, az N—1199 sztereoiszomer keverékre 8,8-nak adódott, míg a görbék meredekségét megadó Hill-szám az előzőeknek megfelelően 0,93 illetve 0,91.

Tekintettel arra, hogy igen kevés kolinolitikumról állt rendelkezésünkre adat az ACh felszabadulásra gyakorolt hatásokról elvégeztük több vegyület vizsgálatát is, de ezek közül csak a kísérletünkben érintett vegyületek adatait tüntettük fel összehasonlítás végett a 2. táblázatban. Egy-egy adat 3 mérés átlaga. A kolinolitikumok koncentrációja 10^{-8} mol/l volt.

2. táblázat

Kolinolitikum	S_2/S_1	ACh felszabadulás- változás %
kontroll	0,74	—
atropin	1,17	58,6
N—1199/a	0,99	33,7
N—1199/b	0,97	31,7
benactyzin	0,99	33,7
dexetimid	1,17	58,6

Kolinolitikus vegyületek hatása az ACh felszabadulásra

*A felszabadult frakciók aránya és a felszabadulás-változás %-ban kifejezve**

A vizsgált kolinolitikumok kivétel nélkül fokozták az ACh felszabadulását 32—59%-kal. Hasonló mértékű növekedést találtunk néhány kolinolitikus hatással nem rendelkező vegyületnél is. Például a diazepam 30,4; a Mydeton 46,6%-kal növelte meg az ACh felszabadulását amelyeket a táblázatban nem tüntettünk fel.

A toxicitás vizsgálatok azt mutatták, hogy az N—1199 mindhárom sztereoizomereje az atropinhoz képest jóval toxikusabb úgy a patkányon, mind az egéren vizsgálva, de különösen toxikusak a b és c jelű izomerek. A letális dózist kapott állatok 10 percen belül elpusztulnak és megfigyelés alapján úgy tűnik, hogy légzésbénulás lép fel.

A toxicitási görbék meredekek, amiből arra lehet következtetni, hogy a toxikus célpont egy target, vagy nagyon kevés elemből áll. A toxicitási adatok a 3. táblázatban szerepelnek.

* Egy-egy adat 3 mérés átlaga 10^{-8} mol/l kolinolitikum koncentrációnál

Vegyület	Hím egér		Hím patkány	
	LD ₅₀ μmol/kg (± 95% konf.)	meredek- ség probit lg dózis	LD ₅₀ μmol/kg (± 95% konf.)	meredek- ség probit lg dózis
N—1199/a	149,5 (141—158)	19,7	129,1 (122—136)	18,8
N—1199/b	32,9 (29— 36)	13,1	27,3 (25— 30)	15,3
N—1199/c atropin	38,2 (35— 42)	15,4	34,4 (31— 39) 736 ^a	10,9

^a atropin LD₅₀ irodalmi adat

Az N—1199 sztereo izomerjeinek toxicitása egéren és patkányon ip. adva

A védőhatást patkányokon teszteltük; 20 μmol/kg kolinolitikumot 200 μmol/kg reaktivátorral együtt adva a Vx, illetve szomannal történt mérgezést közvetlenül megelőzően. Az eredményeket a 4. és 5. táblázatok foglalják össze.

4. táblázat

Kezelés	Vx LD ₅₀ μg/kg (95%-os konfidencia- határokkal)	Meredekség Probit lg dózis	Protekcíós index PI = $\frac{\text{LD}_{50} \text{ kezelt}}{\text{LD}_{50} \text{ kezeletlen}}$
—	25,4 (23,1—27,8)	10,2	—
2-PAM	39,0 (34,5—44,1)	7,5	1,53
atropin	57,8 (49,4—67,9)	6,9	2,27
N—1199/a	53,2 (43,8—66,6)	7,0	2,1
N—1199/b	24,9 (22,0—28,2)	9,8	0,98
N—1199/c	25,1 (22,8—27,6)	10,9	0,99
atropin + 2-PAM	165 (104— 261)	2,3	6,5
N—1199/a + 2-PAM	469 (333— 662)	3,4	18,5
dëxetimid + 2-PAM	686 (403—1165)	2,2	27,0
benaktizyn + 2-PAM	496 (344— 716)	3,1	19,5
atropin + 2-PAM + diazepam	724 (558— 939)	4,5	28,5
N—1199/a + 2-PAM diazepam	518 (372— 719)	3,8	20,4
dëxetimid + 2-PAM + diazepam	1588 (1114—2265)	3,8	62,5
benaktizyn + 2-PAM + diazepam	688 (550— 859)	5,2	27,1

Kolinolitikumok védőhatása reaktivátorral és antikonvulzánsal kombinálva
Vx mérgezésben, patkányon

5. táblázat

Kezelés	Szomán LD ₅₀ µg/kg (95% konf. határ)	Meredekség <i>probit</i> lg dózis	Protekción index (PI)
—	85 (77— 99)	13,4	—
atropin +2—PAM	122 (104— 142)	9,4	1,4
atropin +HI—6	228 (205— 251)	12,1	2,7
N—1199/a +2—PAM	128 (114— 140)	15,0	1,5
N—1199/a +HI—6 ⁺	308 (220— 413)	4,6	3,6
N—1199/a +HI—6 ⁺⁺	493 (320—1608)	5,9	5,8

⁺ HI—6200 µmol/kg

⁺⁺ HI—6400 µmol/kg

*Kolinolitikumok és reaktivátorok kombinációjának védőhatása
szomán mérgezésben, patkányon*

Az N—1199 izomerek közül csak az *a* jelzésű védett, a másik kettő hatástalan volt, amelyek egyébként lényegesen toxikusabbak is voltak, mint az *a* jelű. Az atropin és az N—1199/a közel azonos védőhatással rendelkeznek önmagukban, mintegy kétszeresére emelve a Vx LD₅₀ értékét. A védőhatást mutató vegyületek némileg csökkentik a görbe meredekségét, míg a hatástalanok azt sem befolyásolják.

A kolinolitikum-reaktivátor kombinált kezelés atropin esetén közel háromszor, N—1199/a esetén közel kilencszer hatásosabb, mint az egyszerű kezelés. A hatások nem összegeződnek, hanem sokszorozódnak. A leghatékonyabb a dextimid-reaktivátor kezelés.

A kettős kombinált kezelést követően adott diazepam jelentősen megnöveli a védőhatást három vegyületnél. A diazepam kedvező hatása az atropin kezelésénél jelentkezik a legmarkánsabban (több mint négyszeres a növekedés), míg az N—1199/a-nál ez igen csekély (1,1 szeres). Összességében a legjobb hatást a hármas kezelésben is a dextimid szolgáltatta.

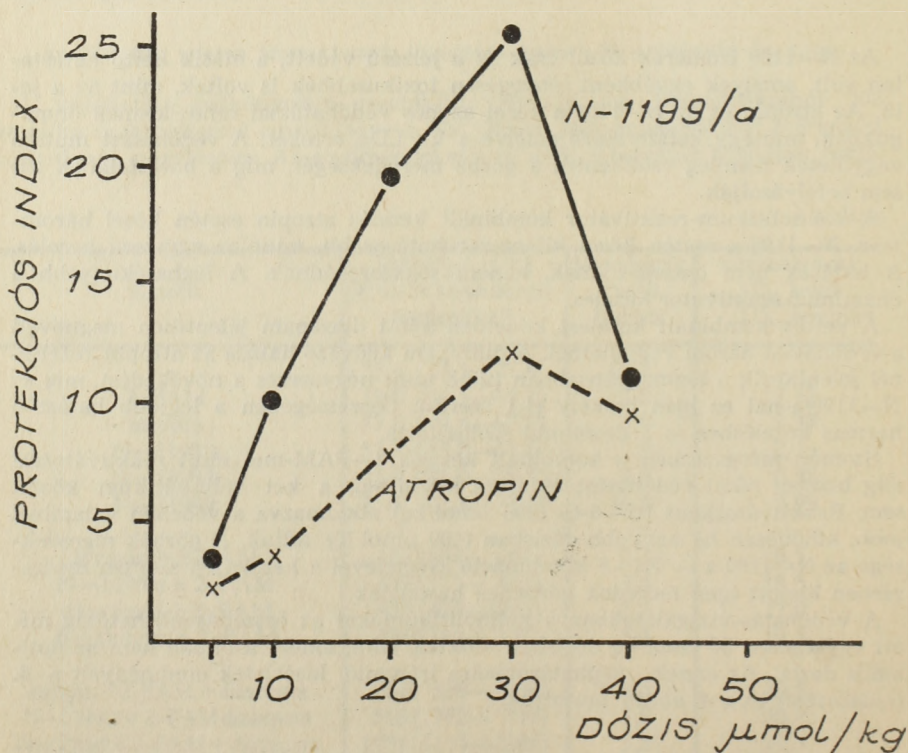
Szomán mérgezésben a kombinált kezelés 2—PAM-mal mint reaktivátorral alig biztosít némi védőhatást és nincs különbség a két kolinolitikum között sem. Reaktivátorként HI—6-os (200 µmol/kg) alkalmazva a védelem valamivel jobb, különösen ha nagyobb dózisban (400 µmol/kg) adjuk. A görbék meredeksége az N—1199/a — HI—6 kombináció kivételével a kezeletlen szomán mérgezésben kapott igen meredek görbéhez hasonlóak.

A védőhatás-vizsgálatokban a kolinolitikumokat az összehasonlíthatóság miatt egységesen 20 µmol/kg dózisban szoktuk adni, amely azonban nem az optimális dózis. Az ennek meghatározására irányuló kísérletek eredményeit a 6. táblázatban és a 4. ábrán mutatjuk.

6. táblázat

Kolinolitikum	Kolinolitikum $\mu\text{mol/kg}$				
	5	10	20	30	40
	protektív index				
N-1199/a	3,4	10,1	19,4	25,4	11,2
atropin	2,2	3,3	7,8	12,1	9,5

A különböző dózisú N-1199/a és atropin, valamint 200 $\mu\text{mol/kg}$ 2-PAM védőhatása (PI) Vx-szel mérgezett egereken



4. ábra: A 200 $\mu\text{mol/kg}$ 2-PAM-mal adott kolinolitikumok védőhatása Vx mérgezésben a dózis függvényében egéren vizsgálva

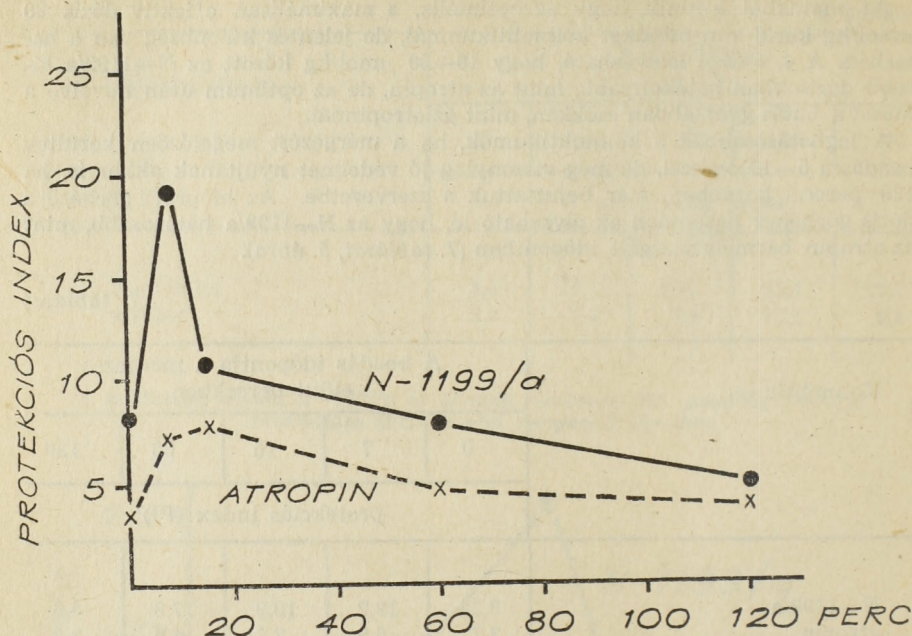
Az adatokból kitűnik, hogy az optimális, a maximálisan effektív dózis 30 $\mu\text{mol/kg}$ körül van mindkét kolinolitikumnál, de jelentős különbség van a hatásban. A 4. ábráról leolvasható, hogy 10–30 $\mu\text{mol/kg}$ között az N–1199/a kisebb dózisokban hatékonyabb, mint az atropin, de az optimum után növelve a dózist a hatás gyorsabban csökken, mint az atropinnál.

A leghatásosabbak a kolinolitikumok, ha a mérgezést megelőzően kerültek beadásra 5–10 perccel, de még viszonylag jó védelmet nyújtanak akkor is, ha 120 perccel korábban már bejuttattuk a szervezetbe. Az időprofil görbéről a dózis görbéhez hasonlóan az olvasható le, hogy az N–1199/a hatásosabb, mint az atropin bármely vizsgált időpontban (7. táblázat, 5. ábra).

7. táblázat

Kolinolitikum	A beadás időpontja a mérgezés előtti percekben				
	0	7	15	60	120
	protekción index (PI)				
N–1199/a	8,24	19,2	10,9	7,8	4,6
atropin	3,7	6,9	7,7	4,6	3,8

A mérgezés előtt különböző időpontokban beadott 20 $\mu\text{mol/kg}$ kolinolitikum, valamint a mérgezést előtt 1 perccel adott 20 $\mu\text{mol/kg}$ 2–PAM védőhatása (protekción index) Vx mérgezésben, egereken



5. ábra: A mérgezés előtt 1 perccel beadott 200 $\mu\text{mol/kg}$ 2—PAM, valamint a mérgezés előtt különböző időpontokban beadott 20 $\mu\text{mol/kg}$ kolinolitikum védőhatása (PI) a kezelés és mérgezés között eltelt idő függvényében

A reaktivátort (2—PAM) a mérgezést megelőzően adtuk 1 perccel, mivel korábbi kísérletünkben azt tapasztaltuk, hogy a mérgezés előtt 60 perccel korábban adott atropin—2—PAM szinte alig védett. Ismert, hogy a 2—PAM igen gyorsan ürül ki a szervezetből és 60 perc után reaktivátor hatás már nem mutatható ki.

Megbeszélés

A glikolsav-észterek a kolinolitikumoknak egyik jelentős csoportját alkotják. Ebbe a csoportba tartoznak olyan vegyületek, mint például a benactyzin, ditran, amelyek kolineszterázbénító mérgezésben hatékonyabb antidotumok, mint az atropin. De ebbe a csoportba tartoznak a quinuklidinol különbözőképpen szusztituált glikolsav-észterei is, amelyek közül a BZ-nek nevezett vegyület mérgező harcanyagként — mint pszihotomimetikum — rendszerezésére is került egyes hadseregekben. A BZ, másnéven QNB a muszkarinerg receptorokhoz legjobban kötődő antagonisták egyike, receptor-kötési vizsgálatokban használt referencia vegyület is. A glikolsav-észterek tehát lehetnek igen jó antidotumok is bizonyos fajta (OF) mérgezésekben, de a központi idegrendszeri hatásukon keresztül cselekvésképtelenséget okozó mérgező harcanyagok is.

A kolinolitikus és inkapacitáló hatások a kémiai szerkezetüknek a függvénye (14). Az észtert alkotó glikolsav, illetve az amino- vagy iminoalkohol egyaránt meghatározó mindkét fajta tulajdonság kialakulásában (2).

Az N—1199 molekula glikolsav része számos hatásos vegyület szerkezetéből ismert difenil származék, míg az aminoalkohol-részt alkotó biciklikus vegyület új, glikolátokban eddig nem alkalmazott komponens.

A glikolsav difenil származékokkal képzett észterek erős centrális pszihotomimetikus és antikolinerg hatású vegyületek. Az amino- (imino-) alkohokok közül a heterociklikus vegyületek rendelkeznek a legerősebb centrális hatással (quinuklidinol, piperidinol), míg az alifások gyengébbek. Nincs tapasztalat az N—1199-ben is szereplő ciklikus amino-alkohollokkal képzett glikolátokkal, milyen ezek biológiai, azaz pszihotomimetikus és kolinolitikus aktivitása. Ez utóbbi alatt főleg az antikolinészteráz-mérgezésben kifejtett védőhatást értjük.

Ismert, hogy számos vegyület biológiai aktivitása az úgynevezett optikai izometriával jellemzett térszerkezettől is függ. (Jobbra vagy balra forgatja a poláris fény síkját). Mivel a vizsgált molekulánk aszimmetrikus szénatomot nem tartalmaz, optikai izometriával nem kell számolni. A biciklikus amino-alkohol gyűrűjén lévő szubsztituensek a gyűrű síkja felett és alatt is elhelyezkedhetnek (1. ábra), így különböző térszerkezetű izomerek alakulhatnak ki. A szintézis során 4 eltérő térszerkezetű molekula képződhet, amelyeket részben a szintézis egyes lépéseiben, részben utólagosan, esetleg fiziko-kémiai módszerekkel szét lehet választani. Az egyes izomerek lehetséges szerkezetére az NMR spektrum eltolódásából lehet következtetni.

A biológiai vizsgálatok (védőhatás, toxicitás, pA_2 -érték stb.) azt mutatták, hogy az 1. ábrán feltüntetett szerkezetű molekula — a 2α 9β — a biológiailag aktív, kevésbé toxikus és védőhatással rendelkezik. Ez a szerkezet az, amely a receptorhoz tud kapcsolódni, nincs térbeli gátlása. A szerkezetből feltételezhető, hogy a 2β 9β szerkezetű, elenyésző mennyiségben képződő izomer sem hatásos, a másik kettő, vizsgált izomerrel egyetemben. A hatásos 2α 9β izomer mintegy 15 % -ban képződik.

A molekula kolinolitikus hatásának meghatározására irányuló in vitro vizsgálatok eredményeinek megítélése ma még nem egységes, az azokból levonható következtetések nem egyértelműek (12, 13). Ezekből az adatokból nem lehet egyértelműen következtetni például a vegyület várható terápiás hatására kolineszteráz-bénító mérgezésben vagy centrális inkapacitáló hatására. A kolinolitikus hatás hiánya viszont a védőhatás hiányára is utal. Ilyen hatás pl. a tengerimalac ileum hosszanti izmán mért pA_2 érték. Tapasztalatok szerint, ha a mért $pA_2 < 7$, a vegyület nem rendelkezik védőhatással, de számszerű értéke nem mutat szoros összefüggést a hatással. Az atropint mint referencia vegyületet használtuk. Ehhez viszonyítva az N—1199/a némileg gyengébb anti ACh hatást mutat (2. ábra, 1. táblázat), de nem olyan mértékben mint azt György és munkatársai kimérték (3). A görbék meredekségét megadó Hill-szám 1-hez közeli értéke azt jelzi, hogy a vizsgált vegyület kompetitív antagonistája a receptoron, és egy receptorhelyhez egy molekula kapcsolódik. Az N—1199/b pA_2 értéke és Hill-száma arra utal, hogy a vegyület nem tekinthető igazi muszkari-nerg antagonistának.

Az agyhomogénaton végzett vizsgálatokból hasonló következtetés vonható le, noha az antropin és az N—1199 izomerelegy K_D értéke között nagyobb a különbség, mint a pA_2 értékeknél volt. Ehhez figyelembe kell venni, hogy a kísérletben alkalmazott izomerkeverékben az aktívnak mutatózó N—1199/a mintegy 15 % -ban van jelen, és ha a koncentrációt ennek figyelembevételével korigáljuk a különbség már lényegesen kisebb lesz (3. ábra).

A kolinolitikumok ACh-felszabadulásra gyakorolt hatásából sem lehet levonni olyan következtetést, amely a védőhatásra utalna. Korábbi vizsgálatok azt

mutatták (10), hogy az atropin megnöveli az ACh kibocsátását az idegvégződéseken, mivel feltételezések szerint részben fokozza az ACh szintézisét, részben gátolja a visszacsatolást a preszinaptikus receptorokon (11). Mivel ez a szabályozás egyfajta — feltehetően a posztszinaptikus receptorhoz hasonló — receptoron játszódik le, várható lenne, hogy az egyes antagonisták itt is úgy viselkednek, mint a posztszinaptikus receptoron. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a potens kolinolitikumok és a csekély biológiai hatást felmutató N—1199/b sztereoizomer közel azonos mértékű ACh-felszabadulás növekedést eredményeznek (2. táblázat). Ebből arra lehet következtetni, hogy az ismert receptor-ligand kölcsönhatás nem érvényes a preszinaptikus receptorra, vagy más tényezők is szerepet játszanak.

Az N—1199 izomerek toxikusabbak, mint az atropin, különösen a nagyon gyenge kolinolitikus, de védő hatást nem mutató sztereoizomerek. A hatásos izomer toxicitása (LD_{50} 130—150 μ mol/kg) elfogadható, azaz a leghatásosabb dózis (30 μ mol/kg) messze a toxikus dózis alatt van. Érdekes jelenség, hogy a jóval toxikusabb izomerek kolinolitikus és védőhatást nem mutatnak (3 táblázat), amiből arra lehet következtetni, hogy a toxikus hatás nem a kolinerg rendszer zavarában jelentkezik. A toxicitási görbék meredeksége azt mutatja, hogy igen szűk a dózistartomány, amelyen belül a letális hatás bekövetkezik. Ez arra utal, hogy az elsődleges biológiai kölcsönhatás vagy behatás — és az utolsó fizioiogiás történés (például: a légzőközpont bénulása) között kevés láncszem van.

A kolinolitikumok önmagukban általában kétszeresére emelik a mérgezőanyagok LD_{50} értékét, de az egyes vegyületekre kapott protekciós indexek alig különböznek egymástól (4. táblázat), ezért az önmagában való alkalmazás nem alkalmas a kolinolitikumok összehasonlító vizsgálatára. Az N—1199/a izomer az atropinhoz hasonló védőhatást mutatott, míg a b és c izomerek nem védtek, ezért kizártuk a további vizsgálatokból.

A reaktívátorok és kolinolitikumok gyenge védőhatása együttes alkalmazásnál többszöröseire emelkedik. Az N—1199/a az atropint messze meghaladó védőhatást mutat 2—PAM-mal kombinálva. Hasonló hatást mutat a rokon szerkezetű (glikolát-észter) benactyzin is, de ezeket is felülmúlja a dexetimid Magyarországon Tremblex néven van forgalomban) — 2—PAM-kombináció (4. táblázat).

A kolineszteráz reaktívátorok terápiás hatása csak részben hozható összefüggésbe a reaktíválóhatással, egyéb farmakológiai hatások is fellépnek, amelyek még nagyrészt nem tisztázottak. Nem tudjuk, hogy mi az oka annak, hogy az önmagában kissé jobb hatású atropin ($PI=2,27$) a 2—PAM-mal gyengébb terápiás hatást ad ($PI=6,5$), mint az önmagában némileg gyengébb N—1199/a ($PI=2,1$) ugyancsak a 2—PAM-mal kombinálva ($PI=18,5$). A 2—PAM reaktíváló hatását mindkét esetben azonos effektivitásúnak kell feltételezni, tehát itt nem a reaktíváló hatás az, ami lényegesen javít a terápiás hatásban.

A kolinolitikum-reaktívátor kezelést az antikonvulzáns diazepammal kiegészítve még tovább fokozható a terápiás hatás, kivéve az N—1199/a-t, ahol már csekély a védőhatás növekedése. *Felvetődik az lehetőség, hogy az N—1199/a rendelkezik antikonvulzáns hatással önmagában is, ezért a diazepam már nem sokat javít a hatásán.* Ez esetben már az önmagában történő alkalmazásnál is kellene jelentkeznie az antikonvulzív protekciós hatásnak.

Kétségtelen, az N—1199/a-val kezelt állatok nyugodtabbak mint az atropinotzottak, de a protekciós index értékében nem mutatkozik ez az antikonvulzív hatás.

Szomán mérgezésben már nem tapasztalható különbség a 2—PAM-mal kombinált atropin, valamint az N—1199/a kezelés eredményében, és a protekciós index 1,5 körüli csupán. A 2—PAM helyett HI—6-ot alkalmazva nagyobb dózisban (400 $\mu\text{mol/kg}$) valamivel kedvezőbb a kép, de ez az eredmény sem túlzottan biztató (5. sz. táblázat).

A szomán mérgezés gyógyszeres kezelésének csekély hatásosságában az játszik szerepet elsősorban, hogy a szománnal foszforilált kolineszteráz egy úgynevezett öregedési folyamatban reaktiválhatatlanná válik. Az öregedési folyamat szománnál néhány perc alatt bekövetkezik így a rektivátornak nagyon csekély a reaktíváló hatása, de nem tapasztalható az a kedvező egyéb farmakológiai hatás sem, mint ami például a V_x mérgezésben kimutatható.

A kísérletekben kapott eredmények önkényesen választott körülmények között születtek, figyelmen kívül hagyva az egyes farmakonok speciális sajátosságait, mint például a hatás fellépésének időpontja, tartóssága, a szervezetben történő eloszlás, metabolizmus, kiürülés, az optimális dózis stb. Ily módon az azonos paraméterek az egyes vegyületek optimunára nézve mégsem azonosak, tehát az összehasonlítás nem tükrözi a vegyület valós értékeit.

Ezt igazolják a maximális effektív dózis meghatározása során kapott mérési eredmények is (4. ábra). Úgy az atropinnak, mint az N—1199/a-nak a leghatékonyabb dózisa 30 $\mu\text{mol/kg}$; 40 $\mu\text{mol/kg}$ -nál már alig jobb az N—1199/a mint az atropin és a görbe menetét 50 $\mu\text{mol/kg}$ -ra extrapolálva valószínű, hogy az atropin már felülmúlja az N—1199/a hatását. Az is leolvasható a görbék menetéből, hogy 5—30 $\mu\text{mol/kg}$ dózis között az N—1199/a az atropinnál kisebb mennyiségben is hatékonyabb mint az atropin. Ennek, különösen a farmakonnak a szervezetből való kiürülés szakaszában van jelentősége. Az atropin mennyiségét növelve egy bizonyos dózishatár után már nem nő a védőhatás, de elég hosszú szakaszon közel azonos értéket mutat. Az N—1199/a-nál a maximális védőhatást biztosító dózis után még tovább növelve a dózist a védőhatás hirtelen csökkenni kezd, és egy bizonyos érték felett már nem véd. A védőhatás csökkenésében valószínű a kolinolitikum saját toxicitása is szerepet játszik.

Hasonlóan eltérő a két kolinolitikum védőhatás időpontja is (5. ábra). Azt vizsgálva, hogy a mérgezés előtt beadva a kolinolitikumot mennyi ideig véd, azt tapasztaltuk, hogy az N—1199/a akkor a leghatékonyabb, ha a mérgezést 5—10 perccel megelőzően kerül a szervezetbe ip úton. Az atropinnál inkább a 10—15 perc tűnik optimálisnak. Míg az N—1199/a-nál az optimális időpontban kiugróan magas a védőhatás a többi időponthoz képest, az atropinnál az optimum után hosszú időn keresztül alig csökken a hatás.

A két vegyület közeli pA_2 értékei azt mutatják, hogy a kolinolitikum-receptor kölcsönhatás hasonló sebességgel játszódhat le mindkét vegyületnél, ezért az N—1199/a szűk időintervallumú kiugró hatása feltehetően inkább farmakokinetikai hatásokkal hozható összefüggésbe.

Mindenesetre ismételtén bizonyított az N—1199/a atropinnál kedvezőbb védőhatása, mivel a 0—120 perc időintervallumban bármelyik időpontban a mérgezés előtt adva jobban véd, mint az atropin.

A vizsgálatok eredményeit összegezve megállapíthatjuk, hogy az N—1199/a jelű glikolsav-észter az atropinnál, a foszforsav-észter mérgezésben legelterjedtebben alkalmazott kolinolitikus vegyületnél hatásosabb antidotum V_x mérgezésben. Szomán mérgezésben csak a HI—6 reaktívátorral való kombinációban mutat jobb védőhatást. Megjegyzendő, hogy az N—1199 in vitro vizsgálatokban nem érte el az atropin hatását.

Az előzetes vizsgálatok azt is igazolták, hogy a vegyület pszihotomimetikus hatása gyenge, ezért számba jöhet mint a kolineszteráz mérgezések hatásos antidotuma, esetleges kardiovaszkuláris és légzésdepresszív hatás kísérletes elemzése után.

Köszönetnyilvánítás: Ezúton is köszönetet mondunk dr. prof. Nádor Károlynak az általa rendelkezésünkre bocsátott vegyületekért, azok analitikai vizsgálataiért.

IRODALOM

1. Usdin E.: in International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics. Sec. 13. Vol. I. Pergamon Press, Oxford, 1970, p. 47.
2. Inch T. D., Brimblecombe R. W.: in Int. Rev. of Neurobiology Vol. 16. Acad Press. Inc. N. Y. 1974, p. 67.
3. György L. és munkatársai: Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 1970, 37, 313.
4. Schild H. O.: Br. J. Pharmacol. 1947, 3, 174.
5. Arunlakshana O., Schild H. O.: Br. J. Pharmacol. 1959, 14, 48
6. Lowry O. H. és munkatársai: J. Biol. Chem. 1951, 193, 265.
7. Bennett Jr. J. P.: in Neurotransmitter Receptor Binding Ed.: Yamamura H. I. et al. Raven Press N. Y. 1978, p. 57.
8. Paton W. D. M., Vizi E. S.: Br. J. Pharmacol. 1969, 48, 11.
9. Finney D. J.: Probit Analysis. Cambridge, 1971.
10. Szerb J. C. és munkatársai: Can. J. Physiol. Pharmacol. 1970, 48, 780.
11. Vizi E. S. és munkatársai: J. Pharm. Pharmacol. 1974, 29, 62.
12. Green D. M. és munkatársai: J. Pharm. Pharmacol. 1974, 29, 62.
13. Faff J. és munkatársai: Arch. Toxicol. 1976, 36, 139.
14. Abood L. G.: in Drugs Affecting the Central Nervous System Vol. 2. Ed: A. Burger, Marcel Decker Inc. N. Y. 1968, p. 127.

Szerző címe: Dr. Máté László, 1026 Budapest, Pasaréti út 86/a.

Lt. Col. L. Máté, I. Wolf, Cs. Szalai, A. Töröcsik:

A NEW CHOLINOLYTIC COMPOUND FOR TREATMENT OF INTOXICATIONS BY CHOLINESTERASE INHIBITORS

The authors investigated some in vitro properties of a new cholinolytic compound — glycolate ester coded as N—1199/e. g. pA₂, receptor binding and so on/and its protective effect in V_x and Soman intoxications. It has been found that the in vitro properties of the new compound are not so expressed than that of the atropine but its protective efficiency is significantly higher than the atropine effect.

Подполковник инж. Л. Мате, И. Вольф, Ч. Салаи, А. Тёрёчик:

НОВОЕ ХОЛИНОЛИТИЧЕСКОЕ СОЕДИНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОТРАВЛЕНИЙ ИНГИБИТОРОМ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Авторы исследовали некоторые in vitro свойства (например pA₂, рецепторное связывание и т. п.) нового холинолитического соединения — эфир гликолата под кодовым названием N—1199 и защитный эффект его при отравлениях V_x и Зоманом. Было установлено, что холинолитические свойства данного соединения in vitro немного отстают от таких свойств атропина, но в отравлениях ингибиторами холинэстеразы (V_x, Зоман) его эффективность значительно превышает действие атропина.