

# KÍSÉRLETES KÖZLEMÉNY

## Alkilfoszfát-mérgezések biokémiai vizsgálata\*

Írta: Gyarmati László dr. gyógyszerész őrnagy

Jelen közleményben az alkilfoszfát típusú idegmérgek (DFP, Tabun, Sarin) okozta mérgezések kémiai, ill. biokémiai kimutatására irányuló vizsgálatainkról, valamint a nem specifikus kolineszteráze (továbbiakban CHE) aktivitásának az alakulásáról kívánok beszámolni.

Az alkilfoszfátok kémiai kimutatására a következő lehetőségek állnak rendelkezésünkre: a) az alkotó elemek vagy gyökcsoportok kimutatása, b) az egész molekulára jellemző kémiai reakció. Az előbbieket biológiai anyagban nem jöhetnek számításba. A második lehetőség, azaz az egész molekulára jellemző reakció, az ún. *Schönemann-reakció*. Ennek lényege: az alkilfoszfátok lúgos, hidrogén-hiperoxid hatására perfoszforsavvá alakulnak, a perfoszforsav pedig néhány aromás diamint színes vegyületté oxidál. A szín erőssége alkalmas körülmény között arányos a jelenlevő alkilfoszfát mennyiségével. Ezt a reakciót vizsgáltuk, alkalmas-e a DFP és analógjainak a biológiai közegben való kimutatására.

Kidolgoztunk olyan eljárást, amelynek segítségével vérből és szérumból kb. 10—15 %-os veszteséggel ki lehet mutatni a hozzáadott DFP-t úgy, ha — az enzimmolyomatok gátlásának céljából — a szérumot acetonnal azonnal denaturáljuk.

A mérgezett állatok véréből, szérumából azonban már nem tudtuk kimutatni a bomlatlan DFP molekulát. E jelenség okát vizsgáltuk modell kísérletekben — az említett módszerrel — és megállapítottuk, hogy a vér és a szérum viszonylag gyorsan elbontja a DFP-t. 20—50  $\mu$  g/ml koncentrációban a DFP a különböző szérumokban változó gyorsasággal, általában 5—20 percen belül elbomlik. (E vizsgálatainkat részletesen a Honvéderorvosban már ismertettük: 1961).

A továbbiakban vizsgálatainkat kiterjesztettük annak a tisztázására, hogy a Tabun és a Sarin hogyan bomlik a szérumban és a vérben. Megállapítottuk, hogy ezek is gyorsan, kb. egyforma sebességgel, a DFP-nél valamivel gyorsabban bomlanak.

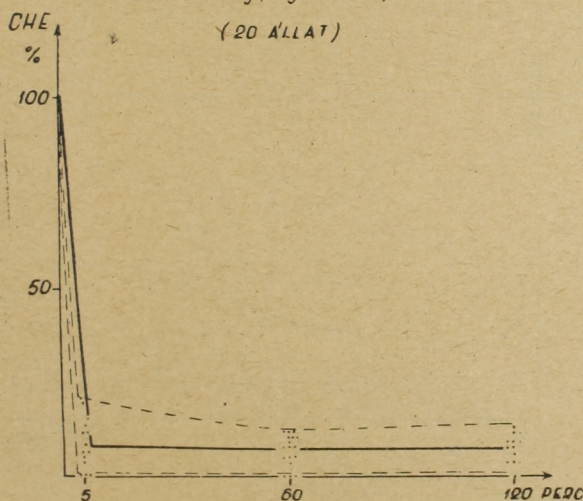
Ezért a mérgezést és a szubtoxikus állapotot — más úton — a CHE aktivitásának a bénítása útján próbáltuk bizonyítani, miután az említett vegyületek igen kifejezett CHE bénító hatással rendelkeznek.

\* Az V. Honvéderorvosi Tudományos Értekezleten elhangzott előadás. (1961. október 28.)



Ebből a célból kidolgoztunk új CHE-aktivitás meghatározási eljárást, amely gyorsabb és egyszerűbb az ismert eljárásoknál és a CHE aktivitásának változását gyorsan és érzékenyen követi. A módszer lényege a következő: a sárga színű azonaftilacetát (szubsztrát) a CHE hatására hidrolizál. A hidrolízis egyik terméke, az azonaftol, élénk piros színű. A kialakuló piros szín erőssége megfelelő körülmények között alkalmas a CHE aktivitásának mérésére. A módszer részleteit *Kísérletes Orvostudomány* című folyóiratban közöltük (1960). A módszerrel kapcsolatban megjegyezzük még, hogy néhány módosítással alkalmassá tettük a szövetek CHE-aktivitásának mérésére, továbbá a módszer alkalmas lehet tábori körülmények között a CHE aktivitásának, illetőleg a bénításának vizuális értékelésére, mert a kialakuló piros szín igen jól érzékelhető.

SÉRUM CHE ALAKULÁSA PATKÁNYOKNÁL  
DFP-VEL TÖRTÉNT MÉRGEZÉSKOR  
DOSIS 1 mg/kg DFP i.p.



1. sz. ábra

Módszerünkkel megvizsgáltuk a CHE alakulásának dinamikáját patkányokon, röviddel a mérgezés után, hogy megállapítsuk a CHE aktivitásában bekövetkező csökkenést, alkalmas-e a mérgezés hatásának kimutatására szubtoxikus adagok esetén, azaz olyankor, amikor a mérgezés klinikai tünetei még nem, vagy csak igen enyhe formában fejlődtek ki.

Ezeket a vizsgálatokat a következő módszerrel végeztük:

DFP-ből a patkányok i. p. 0,25, 0,5, 1,0 mg/kg-ot kaptak, gyomorszondán át pedig 1 mg/kg-ot, kaptak vizes oldatban.

Tabunból a patkányok i. p. 0,1 mg/kg-ot és gyomorszondán 0,25 mg/kg-ot kaptak vizes oldatban.

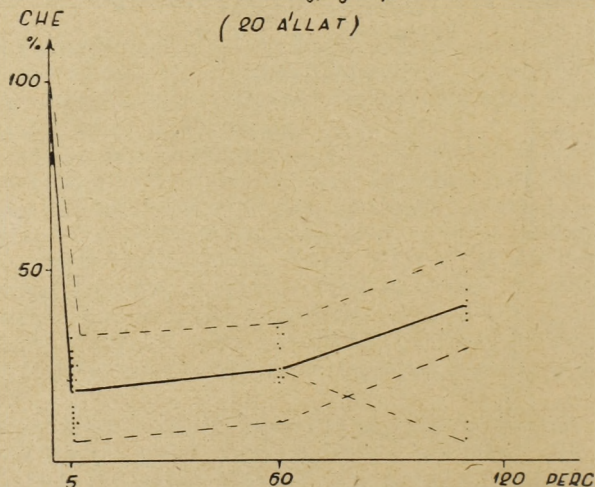
Sarinből a patkányok i. p. 0,05 mg/kg-ot és gyomorszondán át 0,1 mg/kg-ot kaptak, ugyancsak vizes oldatban.



Az adagok megválasztása a következő szempont szerint történt: a szubtoxikus állapot elérésére annak a dózisonak a felét (ill. egynegyedét) alkalmaztuk, amely az állatok mindegyikénél jellegzetes klinikai tüneteket, heves görcsöket okozott, azaz a toxikus dózis felét alkalmaztuk. A vért farokvénából vettük, a mérgezés előtt, majd a mérgezés után 5, 60, 120 perc és 24 óra múlva. A korai, két órán belüli CHE-aktivitás változásokat a következő (1., 2., 3. sz. ábrák) mutatják.

A DFP i. p. adagolt szubtoxikus adagjainak hatására a szérumban a CHE-szintje 5 percen belül az eredeti érték 0—20%-ára csökkent (közéértékben 10%-ra) és ezen a szinten mozog az elkövetkező két órában is.

A SERUM CHE ALAKULÁSA A PATKÁNYOKNÁL TABUNNAL  
TÖRTÉNT MÉRGEZÉSKOR  
DOSIS 0,1 mg/kg i. p.  
(20 ÁLLAT)



2. sz. ábra

Az i. p. adagolt Tabun toxikus adagjainál a CHE-aktivitás az első 5 percen az eredeti szint 5—30%-ig csökkent (közéértékben 20%-ra), amely a következő két órában a legtöbb állatnál lassan emelkedni kezdett, de néhányánál közel azonos szinten mozgott.

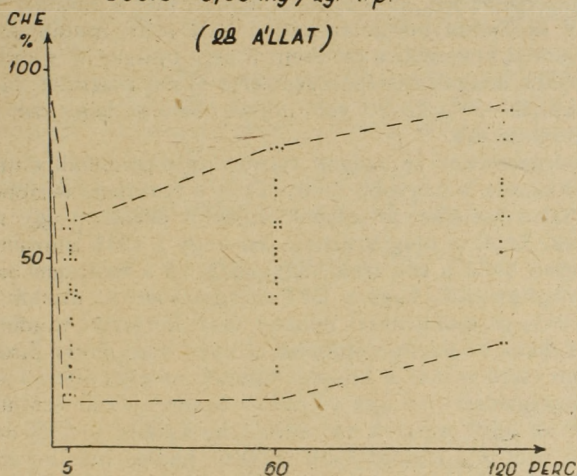
A Sarin i. p. adott szubtoxikus dózisainak hatására az aktivitások kb. 5 perc múlva zömükben a 10—50%-ra csökkentek. A bénulás foka azonban már nem olyan nagyfokú és nem olyan homogén eloszlású, mint a Tabunnál vagy a DFP-nél tapasztalható volt. Úgy, hogy ebben az esetben az átlagolás nem is indokolt és ezért az ábrán ezt nem is jelöltük. A bénítás, bár kevésbé, de azért itt is jellemző — legalább is a korai időszakban —, annak ellenére, hogy a szórás nagy.

Gyomorszondán adagolt mérgek esetében az alkalmazott adagok hatására mindhárom anyagnál a CHE-aktivitás 10 perc múlva az eredeti értéknek kb. 10—30%-ára csökkent, amely további két órában kb. azonos szinten mozgott. (4. számú ábra.)

A SERUM CHE ALAKULÁSA PATKA'NYOKNÁL  
SARINNAL TÖRTÉNT MÉRGEZÉSKOR

DOZIS: 0,05 mg/kg. i.p.

(28 ÁLLAT)



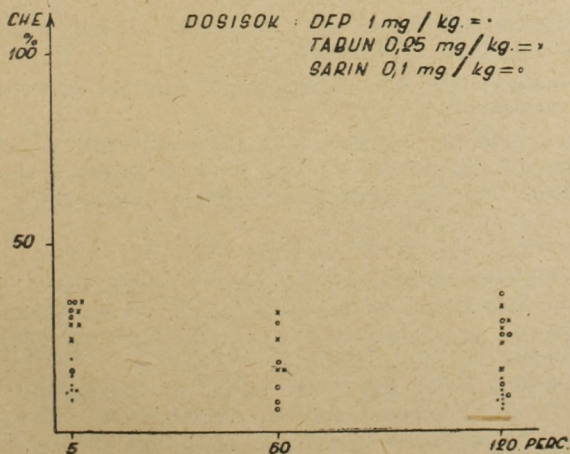
3. sz. ábra

A SERUM CHE ALAKULÁSA A GYOMORSZONDÁN  
ÁT TÖRTÉNT MÉRGEZÉSKOR.

DOZISOK: DFP 1 mg/kg. =

TABUN 0,25 mg/kg. =

SARIN 0,1 mg/kg. =



4. sz. ábra



A CHE aktivitásának a csökkenése az első 5—10 percben, sőt az első órában is jellemző a Tabun és a DFP szubtoxikus adagjainál. Sarinnál a csökkenés nem olyan nagy és a csökkenés mértéke nagyobb szórást mutat.

Azokban az esetekben, amikor az állatokon már a klinikai tünetek mutatkoztak a DFP és Tabun mérgezésekor, a CHE-szint mindig az eredeti érték tizedére vagy annál kevesebbre csökkent 5 perc múlva, ill. 1 órán belül. Sarinnal még a toxikus adagok esetében sem érte el ezt a szintet, hanem általában ennél magasabb, 25—50% között volt, annak ellenére, hogy ezen anyagok közül a Sarin a legtoxikusabb.

A DFP mérgezésekor az adagok viszonylag nagyobbak voltak, így a CHE szintjének csökkenése is nagyobb fokú volt és a restitúció későbbben indult meg. A Tabun és Sarin esetében az adagok abszolút értékben egy nagyságrenddel kisebbek voltak. Ezzel is magyarázható az, hogy a CHE szintjének csökkenése kisebb fokú, ezen belül a szórások nagyobbak, és a restitúció hamarabb indul meg. Azt is megfigyeltük, hogy a DFP-mérgezésben az állatok a CHE-aktivitásnak a 80—90%-os csökkenését néhány órán keresztül minden tünet nélkül elviselték, a Tabun- és Sarin-mérgezéskor ilyen vagy ennél kisebb fokú csökkenés a legtöbb esetben már a klinikai tünetek megjelenésével járt együtt.

Ezek a megfigyelések — úgy véljük — szintén alátámasztják azt a megállapítást, hogy az alkilfoszfátok méregtani hatásában a CHE-bénítés nem az egyetlen, talán nem is a legfontosabb tényező, hanem más kórélettani hatások: kardiovaszkuláris, neurohormonális hatások és más enzimrendszer bénítése is szerepet játszik a méreghatás kifejlesztésében.

Ami a vizsgálati módszer gyakorlati értékét illeti — úgy véljük — alkalmas: a mérgezés tényének a megállapítására, a mikrodózisok szervezetbe való jutásának a bizonyítására — DFP és Tabun esetében —, a felszívódás sebességének, a mentesítési eljárások hatásosságának a vizsgálatára. Ugyanakkor figyelemre méltó az a körülmény, hogy a Sarin toxikus dózisainak a fele sem bénítja oly mértékben és jellegzetesen a CHE-t, mint a Tabun vagy a DFP. Ez pedig a gyakorlat szempontjából azt jelenti, hogy magas toxicitású alkilfoszfátok szubtoxikus dózisainak a szervezetbe való bejutásának a bizonyítására a CHE-aktivitás mérésének a viszonylag egyszerű módszere egyedül nem alkalmas.

Szeretnék röviden beszámolni még a CHE-aktivitás restitúciójának néhány részletfolyamatára irányuló kísérleteinkről.

Ezeket a kérdéseket jelen közleményben csak érintjük, részleteiről későbbiekben kívánunk beszámolni.

Megvizsgáltuk a patkányok savójának CHE-aktivitását: 1. egyszeri szubtoxikus adag után 24 óra múlva és 2. egy hónapon keresztül naponta beadott szubtoxikus dózisok után. Ez utóbbi kísérletnél a patkányok a DFP,  $DL_{50}$ -jének 1/5-ét, ill. 1/10-ét kapták i. p.

Az eredmények a következők voltak:

Az egyszeri szubtoxikus adagokkal történt mérgezések egy részénél 24 óra múlva a CHE-aktivitás elérte, sőt túl is haladta az eredeti szintet. Megfigyeltük, minél kisebb volt az alkalmazott adag, annál gyakoribb volt a teljes restitúció vagy az eredeti szint túllépése (túlkompenzálás).

A krónikus kísérletekben egy hónap múlva az elvéreztetett állatok savójának a CHE-aktivitása a következőképpen alakult: a  $DL_{50}$  1/5-ével és a  $DL_{50}$  1/10-ével harminc napon keresztül naponta mérgezett állatok CHE-aktivitása magasabb volt, mint a kontroll-állatok savójának CHE-aktivitása.

A viszonyokat számszerűen az enzim-aktivitás bontási félideje ( $T_{1/2}$ ) és a



reakció konstansok (elsőrendű reakciót tételezve fel), valamint az 5. sz. ábra mutatja.

A CHE bontási félideje kontroll állatoknál: 24 perc

A CHE bontási félideje  $\frac{DL_{50}}{5}$  mérgezett állatoknál: 18 perc

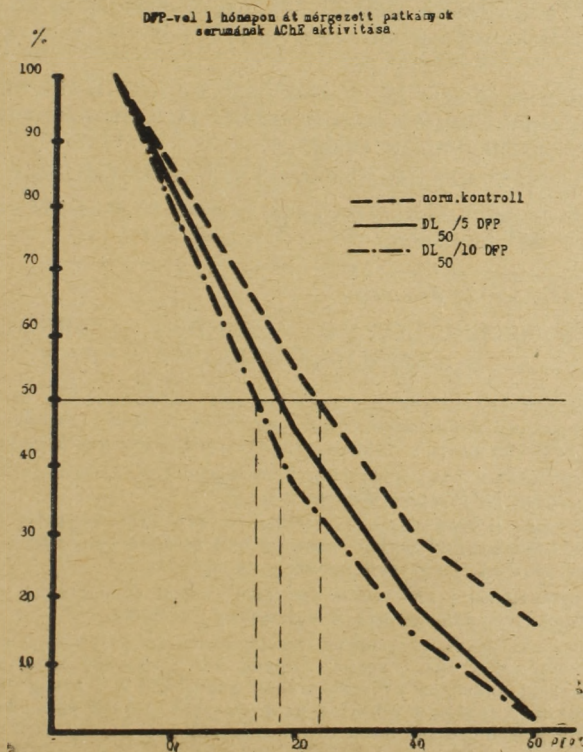
A CHE bontási félideje  $\frac{DL_{50}}{10}$  mérgezett állatoknál: 15 perc

A reakció konstansok pedig rendre a következők:

Kontroll állatoknál:  $3,1 \times 10^{-2}$

$DL_{50}$  1/5-ével mérgezett állatoknál:  $3,9 \times 10^{-2}$

$DL_{50}$  1/10-ével mérgezett állatoknál:  $4,8 \times 10^{-2}$



5. sz. ábra

### Összefoglalás

Eljárást dolgoztunk ki a vérben és szérumban jelen levő alkilfoszfátok kimutatására. Az eljárás a Schönemann-reakción alapul.

Ennek az eljárásnak a segítségével megállapítottuk, hogy az alkilfoszfátok a vérben és szérumban igen gyorsan bomlanak, ezért a mérgezett állatok véréből, szérumából az alkilfoszfátok már röviddel a mérgezés után sem mutathatók ki.



Egyszerű eljárást dolgoztunk ki a szérum CHE-aktivitás meghatározására. A módszer gyors, alkalmazható tábori körülmények között is a CHE aktivitásának, ill. bénításának a megítélésére.

Megvizsgáltuk a patkányok szérum CHE aktivitásának az alakulását a DFP, Tabun, Sarin szubtoxikus dózisaik hatására, röviddel a mérgezés után. Azt találtuk, hogy a DFP és a Tabun szubtoxikus adagjainak hatására az aktivitás már az első 5 percben szignifikánsan csökken és nagyjából ezen a szinten marad 2, ill. 1 óráig. A Sarin szubtoxikus adagjainak hatására a CHE-aktivitás csökkenése kisebb és kevésbé szignifikáns.

Megvizsgáltuk a bénított CHE restitúciójának néhány részletét alkilfoszfátokkal mérgezett patkányok savójában és azt találtuk:

a) a CHE restitúciója egyszeri kis adagokkal történt mérgezések után viszonylag gyors, 24 óra múlva elérheti, sőt meg is haladhatja az eredeti szintet — ennek valószínűsége annál nagyobb, minél kisebb volt az alkalmazott adag,

b) hosszú időn át adagolt kis dózisok hatására a CHE-aktivitás magasabb lesz a kezdeti szintnél. Ennek a túlkompenzálásnak a mértéke annál nagyobb, minél kisebb volt az alkalmazott adag.

Ezekben a vizsgálatokban munkatársam volt dr. Dávid Gábor o. alez.

Ezen az úton mondok köszönetet Fáneci István és dr. Kovács Máténé elvtársaknak a technikai munkában nyújtott segítségükért.

*Майор фарм. службы д-р Л. Дьярмати:*

#### БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ОТРАВЛЕНИЯХ АЛКИЛФОСФАТАМИ

Автором трактуются собственные исследования по выявлению отравления нервными ядами химическими и биохимическими способами, а также изменения активности неспецифической холинэстеразы в раннем периоде субтоксических отравлений.

Автором разработан метод определения нераспавшего алкилфосфата в крови и в сыворотке. Метод основан на реакции Шенеманна.

С помощью этого метода удалось установить, что алкилфосфаты распадаются в крови и сыворотке чрезвычайно быстро, поэтому они не обнаруживаются в крови и сыворотке животных уже через краткий промежуток времени.

Автором выработывался простой и быстрый способ определения активности холинэстеразы в сыворотке, приемлемый и в полевых условиях.

Обследовались изменения активности сывороточной холинэстеразы крыс под влиянием субтоксических доз ДФП, Табуна, Зарина через краткий промежуток времени после отравления. Под влиянием субтоксических доз ДФП и Табуна активность снижается уже в первые 5 минут и остается на этом уровне 1—2 часа. Такое снижение обнаруживается в меньшей степени после субтоксических доз Зарина.

Обследовались некоторые детали восстановления заторможенной холинэстеразы в сыворотке крыс отравленных алкилфосфатами:

a) восстановление холинэстеразы происходит сравнительно быстро после отравления малыми однократными дозами. Достигается исходный уровень через 24 ч.

b) при применении малых повторных доз через длительное время, активность холинэстеразы становится выше исходного уровня. Размер этой чрезмерной компенсации тем больше, чем меньше были дозы.

Dr. L. Gyarmati, Apoth.—Major:

BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER ALKYLPHOSPHATVERGIFTUNGEN