

Dr. Máté László mérnök alezredes, Dr. Wolf Imre

Kolineszteráz reaktivátorok hatásosságának vizsgálata kísérletes dimetoát mérgezésben

Érkezett: 1985. 11. 12.

Kulcsszavak: reaktivátorok, dimetoát, atropin, kolineszteráz

A kolineszteráz bénító dimetoát mérgezésben az enzimreaktivátorok hatásosságáról szóló irodalmi adatok ellentmondók. Ennek tisztázására végeztek vizsgálatokat a szerzők. Megállapították, hogy in vitro jól reaktiválható az in vivo bénított vér és agyi kolineszteráz 2-PAM-mal, Toxogoninnal és HI-6-tal. Kimutatható az in vivo alkalmazott reaktivátorok enzimreaktiváló hatása is. Ennek ellenére a reaktivátorok az atropinnal kombinált kezelésben csökkentették a kolinolitikum terápiás hatását, ezért dimetoát mérgezésben a vizsgált reaktivátorok adása kontraindikált.

A növényvédőszeresek nagyüzemi és háztáji gazdaságokban történt elterjedésével viszonylag nagy számban fordulnak elő ezekkel a szerekekkel mérgezések, melyek között vezető helyen szerepelnek az öngyilkossági szándékkal elkövetett mérgezések (7). Mérgező anyagot tekintve a dimetoát (Bi-58) vezeti a listát (12, 13, 16, 27).

A dimetoát foszforsavészter, amelynek toxikus hatása elsősorban a kolineszteráz (ChE) bénításán keresztül nyilvánul meg. Az antikolineszteráz mérgezések egyik specifikus antidótuma az atropin, amelynek muskarin receptor blokkoló hatása független az antikolineszterináz kémiai szerkezetétől. A másik specifikus antidótum, az enzimreaktivátor hatásossága azonban jelentős mértékben függ egyrészt az antikolineszteráz, másrészt a reaktivátor kémiai szerkezetétől, így adott intoxikáció esetén a reaktivátorok alkalmazása megfelelő mérlegelést igényel.

A dimetoát mérgezésben alkalmazott enzimreaktivátorok hatásosságát illetően az irodalomban ellentmondó adatokat találunk. Zech és mtsai (26) a dimetoáttal bénított lószérum ChE-hez adott Toxogonintól további aktivitáscsökkenést tapasztaltak. In vivo kísérleteikben az LD₅₀ mennyiséggel szájon át mérgezett egerek Toxogonin, illetve 2-PAM kezelés után mind elhullottak, ami a toxicitás fokozódására utal. Sanderson és Edson (21) dimetoáttal mérgezett patkányokon 2-PAM kezelés

Kémiai elnevezések

Dimetoát: 0,0-dimetil-S-(N-metil-karbamoil-metil)-ditiofoszfát.

DDVP: 0,0-dimetil-2,2-diklór-vinil-foszfát.

2-PAM (pralidoxim): 2-hidroxiimino-metilpiridin-1-metiljodid.

Toxogonin (obidoxim, LüH-6): -bis-(4-hidroxiimino-metil-piridin-1)1(-metil)éter-diklorid.

HI-6: (2-hidroxiimonometil)-piridin-(1)-metil(-)(4-karbamoil)-piridin-(1/metil)éter.

után nem észleltek javulást az állatok állapotában. *Lundi és Trambley* (15) szerint a dimetoát rezisztens a hagyományos oxim terápiával szemben. *Kisielinski és mtsai.* (10) viszont kimutatták, hogy a Toxogonin növeli a bénított vér aktivitását és kedvezően befolyásolja az állatok túlélését. *Erdman* (3) Toxogonin kezelés hatására a plazma pseudo-kolinesterináz (BuChE) aktivitásának csökkenésével egyidejűleg a vörösvértest acetilkolinesteráz (AChE) aktivitásának növekedését figyelte meg.

A dimetoát mérgezés nagyszámú hazai előfordulása, és ennek kapcsán a reaktívátorok terápiás alkalmazásának hatásossága körüli bizonytalanság tisztázására végeztünk in vivo és in vitro vizsgálatokat.

Munkánk során arra kerestünk választ, hogy kísérletes dimetoát mérgezésben a reaktívátor hogyan befolyásolja a vér ChE aktivitását, az in vivo bénított ChE in vitro reaktíválható-e, és végül a reaktívátorral kombinált atropinkezelés milyen mértékben hatásos vagy káros.

Anyagok és módszerek

In vivo kísérletek

Kísérleteinkben CFY törzsű 180—220 g súlyú hím patkányokat használtunk, amelyeknek 16 órán át történt éheztetés után gyomorszondán át adtuk az 50% propilénlikol—víz elegyben oldott 95% tisztaságú dimetoátot (VEB Chemiekombinat Bitterfeld). Mérgezés előtt majd a mérgezést követően 1, 2, 3, 4, 5, 6 óra múlva farkból vett teljes vérből, módosított Ellman módszerrel (18) határoztuk meg a ChE aktivitást. A reaktívátort (Toxogonin, Merck) mérgezés után adtuk intraperitoneálisan az alábbi kísérleti elrendezésben:

1. csoport: csak oldószert kapott (propilénlikol—víz)
2. csoport: 3×25 mg/kg Toxogonin (0; 1 és 2 órákor)
3. csoport: 300 mg/kg dimetoát
4. csoport: 300 mg/kg dimetoát és 3×25 mg/kg Toxogonin (0,5; 1,5 és 2,5 óra múlva)
5. csoport: 300 mg/kg dimetoát és 3×50 mg/kg Toxogonin (0,5; 1,5 és 2,5 óra múlva)
6. csoport: 300 mg/kg dimetoát és 11×10 mg/kg Toxogonin (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 és 5,5 óra múlva)
7. csoport: 25 mg/kg dimetoát
8. csoport: 25 mg/kg dimetoát és 3×25 mg/kg toxogonin (0,5; 1,5 és 2,5 óra múlva).

Egy-egy csoportban 8 állat volt (a kontroll csoportokban: 1., 2. csoport, 5-5 állat). A mért értékeket a mérgezés előtt mért alapaktivitás %-ban fejeztük ki. A táblázatokban és az ábrákon a 8 (5) állat átlagát és a szórást (SD) tüntettük fel.

Az atropin, illetve az atropin- és reaktívátor kombinált kezelés hatását 140—160 g súlyú hím patkányokon vizsgáltuk. A mérgezést 300, 350, 440, 550 és 800 mg/kg dimetoáttal az előzőekben említettek szerint végeztük. A különböző dózisú dimetoáttal mérgezett állatokból 5-5 csoportot képeztünk (összesen 25), 10—12 állattal csoportonként, amelyek a mérgezést követően 0,5; 3 és 6 óra múlva az alábbi kezelést kapták ip.:

1. csoport: 0 (csak dimetoátot kapott)
2. csoport: 3×15 mg/kg atropinszulfát
3. csoport: 3×15 mg/kg atropinszulfát + 3×25 mg/kg 2-PAM

4. csoport: 3×15 mg/kg atropinszulfát + 3×25 mg/kg Toxogonin

5. csoport: 3×15 mg/kg atropinszulfát + 3×25 mg/kg HI—6.

A 2-PAM Raschig gyártmányú volt, a HI—6-ot prof. Nádor bocsátotta rendelkezésünkre. Az állatok elhullását 48 órán át figyeltük. Az elhullás alapján probitanalízist (4) végeztünk.

A számításokat az általunk készített PASCAL nyelvű programmal ZEMA TWIN (Apple II) személyi számítógépen végeztük.

In vitro kísérletek

A dimetoát in vitro inhibíciós hatását, valamint az így bénított vér reaktiválhatóságát humán véren vizsgáltuk. Milliliterenként 500 μ g dimetoátot és (illetve) 50 μ g Toxogonint adtunk 50 μ l ösztérfogatban a teljes vérhez, a mosott vörös vértetekhez és plazmához, majd meghatároztuk a teljes vér, mosott vörösvértetek és plazma aktivitását. Az inkubációs idő mind a dimetoát, mind a Toxogonin hozzáadása után 30 perc volt. A kontroll mintákhoz 50 μ l fiziológiai sóoldatot adtunk, 5 párhuzamos mérést végeztünk.

Az in vivo bénított vér és agyi ChE reaktiválhatóságának vizsgálatára 4-4 állatot 300 mg/kg dimetoáttal szájon át mérgeztük, majd 120 perc múlva elvégeztettük. A heparinnal kezelt 1 ml vérhez 20 μ l térfogatban adtuk a reaktivátorokat (Toxogonin és 2-PAM), hogy azok végkoncentrációja 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} mol/l legyen. A 10^{-3} mol/l koncentrációjú vérekből 5, 10, 15, 20, 25, 30 és 45 perc múlva 5 μ l mintát vettünk, és meghatároztuk a ChE aktivitását. A többi koncentrációnál 30 perc múlva végeztük el az aktivitásmérést.

Az állatok agyát desztillált vízzel 1:9 arányban potteren homogenizáltuk. A homogenátokat a vérhez hasonlóan vizsgáltuk. A vér ChE aktivitását a mérgezés előtt mért aktivitás %-ában, az agyi aktivitást 1 g nedves szöveti súlyra számítva nkatban fejeztük ki. (Kontrollként 20 intakt állat agyának ChE aktivitását meghatározva azt $104 \pm 5,2$ nkat/g-nak találtuk.)

Eredmények

In vivo kísérletek

Az in vivo reaktiválási kísérletek eredményeit az 1. táblázat tartalmazza.

Az 1. ábrán tüntettük fel a dimetoát oldására használt és szájon át adott propilénlikol—víz (kontroll), valamint a reaktiválás során ip. adott 3×25 mg/kg Toxogonin hatását a vér ChE aktivitására.

A kezeléseket követően az aktivitás mindkét csoportnál enyhe emelkedést mutat, amely 4 óra múlva éri el maximumát. A két görbe között nincs szignifikáns különbség. Ezek közel párhuzamos futása arra utal, hogy inkább a kezelés által kiváltott trauma, mintsem az alkalmazott vegyületek okozzák a ChE emelkedést. Ennek alapján a további kísérleteink során nem alkalmaztunk korrekciót a mért ChE értékeknél.

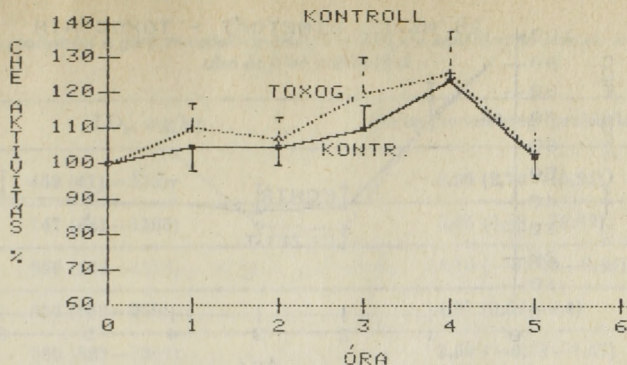
A 300 mg/kg dimetoáttal szájon át végzett mérgezés után a vér ChE aktivitása jelentősen csökken az első 2 órában, (2. ábra, 1. görbe), de ezt követően már nincs számottevő változás.

A 25 mg/kg ip. adott Toxogonin erősen mérsékli a ChE aktivitásának csökkenését az első és második kezelés után (0,5 és 1,5 óra). Ez a mérséklő hatás még a 3.

A dimetódtal po. mérgezett és Toxogoninnal ip. kezelt patkányok vérének aktivitása különböző időpontokban, a mérgezés előtt mért aktivitás %-ában (\pm SD)

Kís. sz.	Dinnetóat mg/kg	Toxogo- nin mg/kg	A Toxogonin kezelés időpontja óra	Óra						
				0	1	2	3	4	5	6
				A teljes véraktivitás % \pm SD						
1.	0	0	—	100,0 \pm 11,92	105,2 \pm 8,67	104,9 \pm 6,93	109,86 \pm 8,58	124,5 \pm 7,45	101,9 \pm 7,61	—
2.	0	3 \times 25	0,5; 1,5; 2,5	100,0 \pm 8,37	109,9 \pm 8,17	107,4 \pm 6,68	120,3 \pm 12,84	126,0 \pm 13,99	102,9 \pm 8,07	—
3.	300	0	—	100,0 \pm 9,53	37,5 \pm 8,67	18,6 \pm 4,61	15,8 \pm 1,68	13,0 \pm 1,76	11,3 \pm 1,84	10,2 \pm 1,71
4.	300	3 \times 25	0,5; 1,5; 2,5	100,0 \pm 16,51	63,3 \pm 6,76	59,7 \pm 9,59	43,1 \pm 6,17	34,0 \pm 6,05	21,6 \pm 3,76	20,6 \pm 4,36
5.	300	3 \times 50	0,5; 1,5; 2,5	100,0 \pm 8,90	46,6 \pm 5,99	45,6 \pm 11,87	40,7 \pm 9,16	+	+	+
6.	300	11 \times 10	0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5	100,0 \pm 11,23	52,8 \pm 5,63	44,5 \pm 8,77	33,2 \pm 10,34	31,0 \pm 7,88	27,7 \pm 8,03	28,1 \pm 8,79
7.	25	0	—	100,0 \pm 12,10	69,1 \pm 13,6	38,2 \pm 7,07	36,5 \pm 8,77	40,2 \pm 7,07	—	41,5 \pm 10,7
8.	25	3 \times 25	0,5; 1,5; 2,5	100,0 \pm 14,39	71,4 \pm 11,2	30,6 \pm 6,28	31,8 \pm 8,72	56,9 \pm 8,51	42,0 \pm 4,36	—

MEGJEGYZÉS: — mérés nem történt
+ minden állat elhullott
n = 8; az 1. és 2. csoportban n = 5

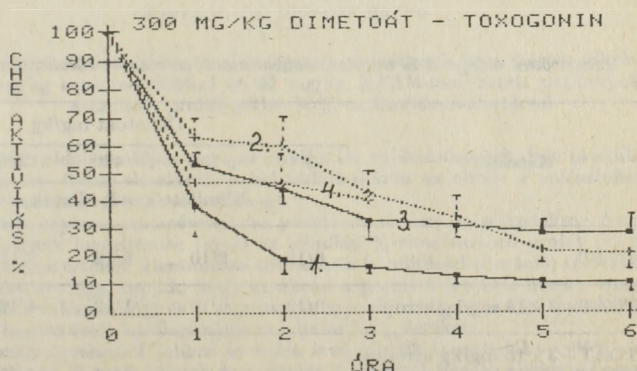


1. ábra Az oldószer (50% propilén-glikol—víz) és a 3×25 mg/kg Toxogonin hatása a patkányvér ChE-aktivitására

kezelés után is megmarad, noha csekélyebb mértékben (2. ábra, 2. görbe). A reaktívátorral kezelt és kezeletlen állatok csoportjai között a ChE aktivitási értékek még 6 óra múlva is szignifikánsan ($P < 0,05$) eltérnek.

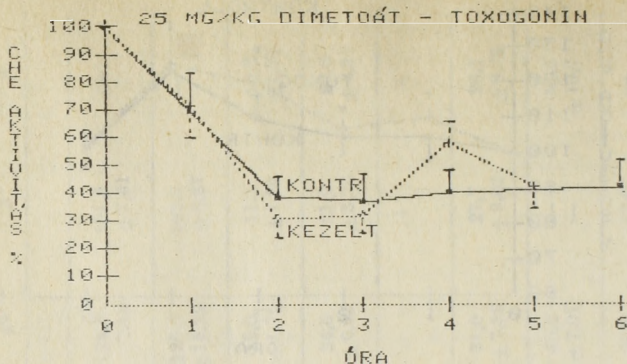
A reaktívátor kezelést gyakrabban, de kisebb dózisban (11×10 mg/kg) alkalmazva, az aktivitás csökkenés még elnyújtottabbá válik (2. ábra, 3. görbe), és az aktivitás a kezeletlen csoporthoz viszonyítva szignifikánsan magasabb szintre áll be.

A reaktívátor dózisának növelésével (3×50 mg/kg) a ChE aktivitása ugyan magasabb szinten marad (2. ábra, 4. görbe), de 4 órán belül minden állat elpusztult. (Az elhullott állatok agyának ChE aktivitása $23,3 \pm 1,66$ nkat/g volt.)



2. ábra A 300 mg/kg dimetoáttal mérgezett és Toxogoninnal kezelt patkányvér ChE-aktivitása. 1. mérgezett kontroll; 2. mérgezett és 3×25 mg/kg Toxogonin; 3. mérgezett és 11×10 mg/kg Toxogonin; 4. mérgezett és 3×50 mg/kg Toxogonin

A 25 mg/kg dimetoát mérgezés után (3. ábra) a Toxogonin kezelés számottevően nem befolyásolja az aktivitás alakulását a kezdeti szakaszban, de a 24 óra múlva mért érték már szignifikánsan magasabb, mint a kezeletlen csoporté (64%, illetve 48%).



3. ábra A 25 mg/kg dimetoáttal mérgezett és 3×25 mg/kg Toxogoninnal kezelt patkányvér ChE-aktivitása

Az atropin, illetve atropin+reaktívator kezelés eredményeit a 2. táblázatban foglaltuk össze. A számlálóban a 48 órán belül elhullott, a nevezőben az összes kezelt állat számát tüntettük fel, amely értékekből a probit analízissel számított LD_{50} értékeket, a regressziós egyenesek meredekség értékeit, valamint a 95%-os konfidencia határokat a 3. táblázatban találjuk.

A probit analízis során számított regressziós egyenesek közül szemléltetés végett egyet ábrázoltunk. A 4. ábrán a dimetoáttal mérgezett, atropinnal és 2-PAM-mal kezelt (3. csoport) állatok elhullását (probit értékét), illetve a számított regressziós egyenest ábrázoltuk a dimetoát dózis logaritmusának függvényében.

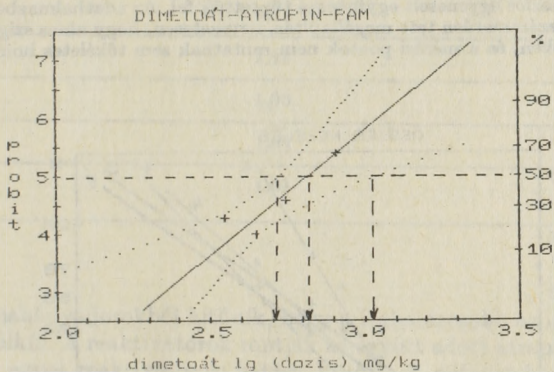
Dimetoáttal mérgezett és antidotumokkal kezelt patkányok elhullása

2. táblázat

Kezelési csoport	Kezelés	Dimetoát mg/kg				
		300	350	440	550	800
		Elhullott/kezelt állatok száma				
1.	DIMETOÁT	0/10	2/10	6/12	8/12	12/12
2.	DIMETOÁT + 3×15 mg/kg atropin	0/10	0/10	1/12	4/12	6/12
3.	DIMETOÁT + 3×15 mg/kg atropin + 3×25 mg/kg 2-PAM	0/10	3/12	2/12	4/12	8/12
4.	DIMETOÁT + 3×15 mg/kg atropin + 3×25 mg/kg Toxogonin	0/10	1/10	2/12	6/12	7/12
5.	DIMETOÁT + 3×15 mg/kg atropin + 3×25 mg/kg HI-6	0/10	2/12	5/12	4/12	7/12

A 48 órán belül elhullott állatok száma/a kezelt állatok száma

Kezelés	LD ₅₀ mg/kg	Görbe meredekség (probit/log dózis)
1.	459 (411—522)	8,99 (2,74—15,25)
2.	747 (621—1166)	5,65 (0,48—10,82)
3.	656 (533—1118)	4,16 (—0,009—8,34)
4.	656 (548—959)	4,97 (0,54—9,4)
5.	660 (523—1361)	3,59 (—0,38—7,57)



4. ábra A különböző dózisu dimetoáttal mérgezett, a mérgezés után három alkalommal (0,5; 3 és 6 óra) 15 mg/kg atropinszulfáttal és 25 mg/kg 2-PAM-mal kezelt patkányok elhullásából számított probit görbe, 95%-os konfidenciahatárral

Az ábra jobb oldali skáláján szerepel az elhullás valószínűsége %-ban (a skála osztása nem lineáris, hanem ún. Gauss-eloszlású), a bal oldali skálán az ehhez a valószínűséghez tartozó probit értékek (probit 5 = 50% valószínűség).

A regressziós egyenes paramétereit (az $y = ax + b$, ahol az a = meredekség, b = y tengelymetszet) a dózis értékek logaritmusai (x) és az elhullás %-ához tartozó probit (y) értékpárokból számítjuk. A pontos értékek kiszámítása többszörös közelítéssel (iteráció) történik.

Az LD₅₀ értéket úgy kapjuk, hogy az ábrán a probit 5 értéktől húzott vízszintes egyenes (50%-os elhullási valószínűség) és a regressziós egyenes metszéspontját levetítjük a dózis tengelyre. Az ott kapott érték antilogaritmusai adja az LD₅₀ értéket.

A regressziós egyenestől jobbra és balra levő görbék (parabolák) a 95%-os konfidenciahatárt jelölik. Ezeknek a görbéknek és a probit 5 értéktől húzott vízszintes egyenes metszéspontjainak a dózistengelyre vetített értékei, illetve azok antilogaritmusai adják az LD₅₀ érték 95%-os konfidenciaszintű alsó és felső határait. Ezen értékek pontos meghatározása nem grafikus úton, hanem számítással történik.

A kovariancia analízissel számított χ^2 (chi négyzet) értékek és az ebből számított P (valószínűségi) értékek a regressziós egyenesek meredekségére és a teljes populáció (minden kísérleti csoport együttesen) heterogenitására vonatkozóan az alábbiaknak adódtak:

	chi négyzet	P	szabadsági fok
paralelitás	5,1032	0,276	4
heterogenitás	12,1276	0,670	15

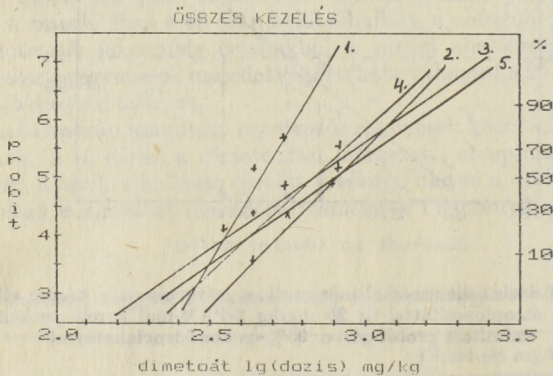
A P-értékek értelmezése:

Ha $P > 0,95$: a regressziós egyenesek szignifikánsan párhuzamosan futnak.

Ha $P < 0,05$: a regressziós egyenesek meredeksége szignifikánsan eltér egymástól.

A $0,95 > P > 0,05$ azt jelenti, hogy az egyenesek meredekségi értékei között nincs szignifikáns eltérés, az egyenesek azonos populációkat reprezentálnak. A számításaink során kapott $P = 0,27$ érték ebbe az intervallumba esik.

A heterogenitás 0,670 értéke a fentiekhez hasonlóan azt jelenti, hogy szignifikánsan sem nem homogén, sem nem heterogén a vizsgálatokban kapott és együttesen vizsgált adathalmaz, hanem megfelel a normális eloszlásnak. Az 5. ábrán az összes csoport mérési eredményeit, valamint az egyes kezelések regressziós egyeneseit együttesen tüntettük fel. Az adathalmazból szemléletesen látszik az előzőekben számszerűen tett megállapítás, nevezetesen, hogy nincs szignifikáns eltérés a görbék meredekségében, és a mérési pontok nem mutatnak sem tökéletes homogenitást, sem heterogenitást.



5. ábra A dimetoáttal mérgezett (1), a mérgezés után atropinnal (2), atropinnal és 2-PAM-mal (3), atropinnal és Toxogoninnal (4), atropinnal és HI-6-tal (5) kezelt állatok elhullási adatai és probit görbéi

A kezelések hatásosságát számszerűen az LD_{50} értékek összevetésével mérhetjük le, képezve a két összehasonlítandó csoport LD_{50} értékeinek a hányadosát, úgy, hogy a számlálóban mindig a nagyobb érték szerepeljen. Az így kapott értéket nevezhetjük potencia hányadosnak vagy terápiás indexnek (TI).

Pl.:

$$TI = \frac{\text{dimetoáttal mérgezett, atropinnal kezelt csop. } LD_{50}}{\text{dimetoáttal mérgezett csop. } LD_{50}} = \frac{747}{459} = 1,63$$

A különböző kezeléseket összevetve a kapott potencia hányadosokat (vagy terápiás indexeket) a 4. táblázat tartalmazza.

Az atropin-, illetve kombinált (atropin + reaktivátor) kezelés hatásossága dimetoát mérgezésben

Kezelés	Potencia hányados (Terápiás index)	Megjegyzés
2 vs 1	1,63	1. DMO
3 vs 1	1,43	2. DMO + Atropin
4 vs 1	1,43	3. DMO—Atr.—2 PAM
5 vs 1	1,44	4. DMO—Atr.—TOX.
2 vs 3	1,14	5. DMO—Atr.—HI—6
2 vs 4	1,14	
2 vs 5	1,13	
3 vs 4	1,00	
5 vs 3	1,01	
5 vs 4	1,01	

A potenciahányadosokból kitűnik, hogy a leghatásosabb az atropin önmagában reaktivátor nélkül. A reaktivátorok rontják az együtt adott atropin hatását, és nincs különbség az egyes reaktivátorok hatása között. A potenciahányadosok alacsony értéke csekély terápiás hatásra utal.

In vitro kísérletek

A dimetoáttal in vitro bénított és Toxogoninnal reaktivált humán vér ChE aktivitás értékét az 5. táblázat tartalmazza.

Az 500 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban levő ($2,18 \times 10^{-3}$ M) dimetoát a teljes vérnél 10% aktivitáscsökkenést eredményez. A vörösvértest ChE aktivitás csupán kismértékben (5%) csökken, de a plazmaaktivitás csökkenése sem jelentős (21%) 30 perc inkubálás után. Az ezt követő reaktivátor kezelés 50 $\mu\text{g/ml}$ Toxogoninnal ($1,30 \times 10^{-4}$ M) az eritrocita ChE aktivitását helyreállítja, de nincs hatással a plazma aktivitására, sőt önmagában kismértékben bénítja azt.

A szájon át történő mérgezés után in vivo bénított vér és agyhomogenát in vitro reaktiválása Toxogoninnal és 2-PAM-mal eltérő kinetikai képet mutat (6. táblázat, 6., 7. ábrák).

10^{-5} M koncentrációban a Toxogonin már 5 perc múlva maximális effektust mutat, míg a 2-PAM kezeléssel a maximális érték kb. 30 perc múlva érhető el.

Vérenél nincs különbség a két kezelés hatása között, míg agyhomogenátnál némi különbség mutatkozik. Az effektusok összehasonlítására tulajdonképpen az ún. reaktiváló hatás (r%) értéke a legalkalmasabb, melyet a következő képlettel számíthatunk ki:

$$r\% = \frac{a_r - a_i}{a_0 - a_i} \times 100,$$

ahol a_0 az alapaktivitás, a_i a bénítás után és a_r a reaktivitás után mért aktivitás.

A 30 perces értékekből $r\%$:

	Toxogonin	2-PAM
Vér	35	36
Agy	60	51

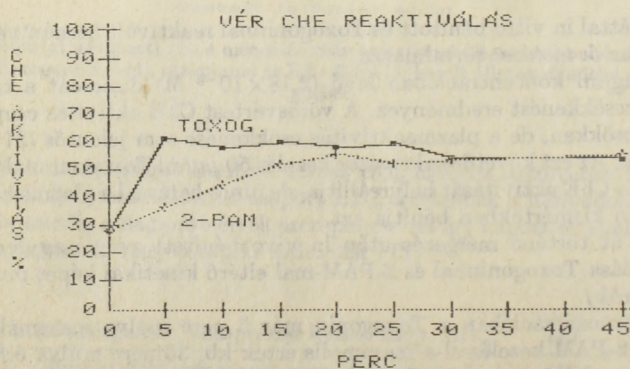
(Az agynál a kontroll csoport $a_0 = 104$ nkat/g értékét alkalmaztuk.)

5. táblázat

Humán teljes vér, mosott eritrocita és plazma ChE aktivitása 500 $\mu\text{g/ml}$.
dimetoát valamint 50 $\mu\text{g/ml}$
Toxogonin kezelés után a kezelés előtti aktivitás százalékában ($\pm SD$)

Kezelés	Teljes vér	Mosott eritrocita	Plazma
—	100 $\pm 5,21$	100 $\pm 3,98$	100 $\pm 6,35$
DIMETOÁT 500 $\mu\text{g/ml}$ és	90 $\pm 5,94$	95 $\pm 7,76$	79 $\pm 14,9$
DIMETOÁT 500 $\mu\text{g/ml}$	101	105	78
TOXOGONIN 50 $\mu\text{g/ml}$	$\pm 3,98$	$\pm 4,76$	$\pm 8,6$
TOXOGONIN 50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\pm 4,61$	103 $\pm 4,16$	82 $\pm 9,29$

($n = 5$)



6. ábra A 300 mg/kg dimetoáttal mérgezett és 120 perc múlva elvezetett patkány vérének ChE-aktivitása 10^{-3}M koncentrációjú reaktivátor kezelés után, a mérgezés előtti aktivitás %-ában

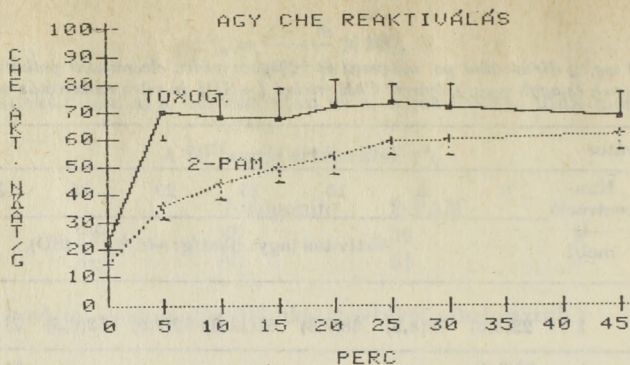
300 mg/kg dimetóáttal po. mérgezett és 120 perc múlva elvértetett patkányok
véreinek és agyhomogenátjának ChE értékei (\pm SD) *in vitro* reaktiválás után

Minta	Reaktivátor		Perc							
	Megne- vezés	Kon- centráció —lg mol/l	0	5	10	15	20	25	30	45
			Aktivitás (agy: nkat/g; vér %) \pm (SD)							
AGY	TOXO- GONIN	3	22(3,6)	70(8,9)	68(7,8)	67(11,0)	72(9,5)	73(6,5)	71(8,4)	68(7,8)
		4	22(3,6)						68 (14,1)	
		5	22(3,6)						39(9,4)	
		6	22(3,6)						25(8,2)	
	2-PAM	3	15(2,8)	36(4,3)	44(4,5)	50(3,8)	54(4,7)	59(5,1)	60(5,2)	62(6,1)
		4	15(2,8)						43(4,8)	
		5	15(2,8)						25(2,8)	
		6	15(2,8)						18(1,7)	
VÉR	TOXO- GONIN	3	28(3,3)	61(8,7)	58(8,1)	60(7,5)	58(6,3)	59(5,7)	54(6,2)	58(4,8)
		4	26(2,3)						48(5,6)	
		5	26(2,3)						35(4,8)	
		6	26(2,3)						29(2,2)	
	2-PAM	3	28(3,3)	37(3,8)	45(3,2)	52(3,8)	55(4,2)	52(6,3)	53(5,9)	55(4,3)
		4	26(2,3)						45(5,1)	
		5	26(2,3)						33(3,2)	
		6	26(2,3)						28(2,1)	

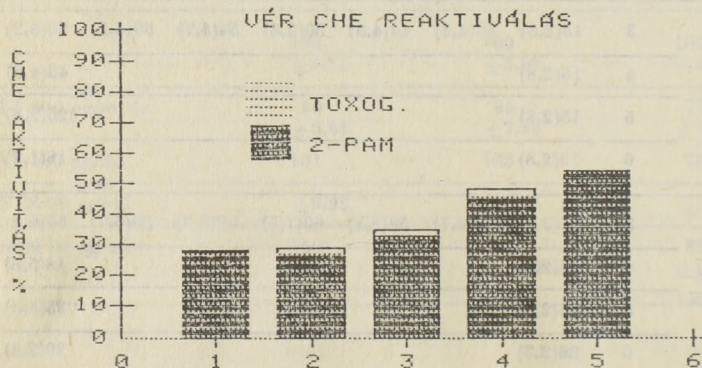
n = 4

A reaktivátor koncentrációjának csökkenésével az effektus is csökken.

Nincs különbség a két reaktivátor hatásában a vér ChE reaktiválása esetén (8. ábra), míg az agynál a Toxogonin effektívebb (9. ábra).



7. ábra A 300 mg/kg dimetoáttal mérgezett és 120 perc múlva elvértetett patkány agyhomogénát ChE-aktivitása 10^{-3} M koncentrációjú reaktivátor kezelés után, nkat/g-ban



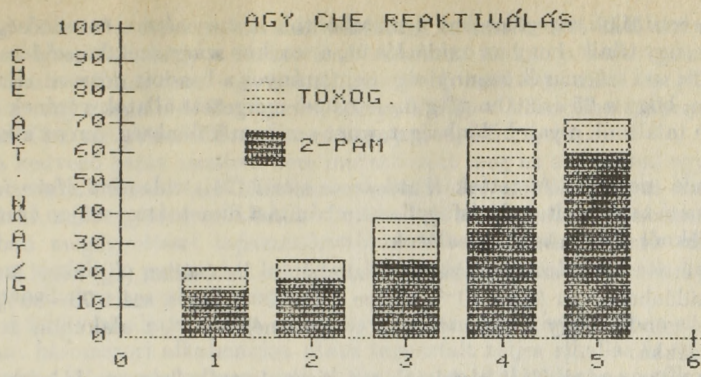
8. ábra A 300 mg/kg dimetoáttal mérgezett és 120 perc múlva elvértetett patkány vérének aktivitása (1); 10^{-6} (2); 10^{-5} (3); 10^{-4} (4) és 10^{-3} (5) koncentrációjú reaktivátorral történt 30 perces inkubálás után

Megbeszélés

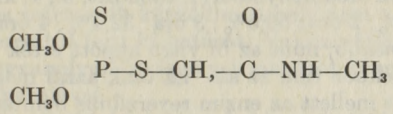
A dimetoát igen gyenge inhibitor, patkány agyhomogénátumban $8,5 \times 10^{-3}$ M koncentrációban okoz 50%-os AChE bénulást (21).

Kísérleteinkben is azt tapasztaltuk, hogy a humán vérhez adva $1,39 \times 10^{-4}$ M koncentrációban az eritrocita AChE-t alig bénítja (5. táblázat).

A gyomor-bél-csatornából gyorsan felszívódik és főleg a májban található poliszubsztát-monooxigenáz (citokrom P-450) rendszer alakítja át toxikus oxí (Á) vagy lényegesen kevésbé toxikus (B) karbonsav származékká, majd mindkettőt további nem toxikus metabolitokká (1, 22).



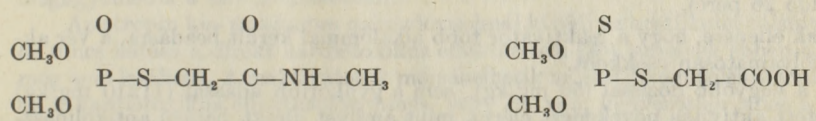
9. ábra A 300 mg/kg dimetoáttal mérgezett és 120 perc múlva elvértetett patkány agyhomogénát aktivitása (1); 10^{-6} (2); 10^{-5} (3); 10^{-4} (4) és 10^{-3} (5) koncentrációjú reaktivátorral történt 30 perces inkubálás után



Dimetoát LD₅₀ patkány po 320—380 mg/kg (459 mg/kg)*

I₅₀ (AChE) 8,5 · 10⁻³ M

A B



dimetoxon LD ₅₀ 55 mg/kg I ₅₀ 1,1 × 10 ⁻⁵	dimetoátsav LD ₅₀ 3000 mg/kg (nem ChE inhibitor)
--	---

A fent vázolt metabolit utak mellett más utak is előfordulnak.
 (* kísérleteinkben kapott érték)

A dimetoát és főbb metabolitjainak kiürülése a szervezetből gyors folyamat. A borjúnak szájon át adott ³²P-vel jelzett dimetoát (10 mg/kg) 87—90%-a 24 óra alatt kiürült. Im. adva ez a mennyiség már 9 óra alatt eltávozott (9).

Az oxo származék kiürülése a vizelettel lényegesen lassúbb, 24 óra alatt kb. 20% ürül ki (2). A legtöbb organofoszfáttól eltérően a dimetoát nem zsírolékony (olívaolajban 1,3%), a zsírszövetekben nem halmozódik fel.

A metabolizmus fő útja a karboxi származékon, a nem toxikus metaboliton át vezet, de a metabolit út függ az állatfajtától, az állat nemétől, valamint a dimetoát koncentrációjától. Patkánynál pl. a nagyobb koncentráció mellett a dimetoátsav a főbb termék, míg alacsonyabb koncentrációnál ez jelentősen csökken. Kísérleteink-

ben, noha analitikai vizsgálatokat a metabolitok mennyiségére és minőségére nem végeztünk, úgy tűnik, hogy az oxidációs út, a toxikus származék képződése limitált. A képződött oxi származék mennyisége nem arányos a beadott dózissal. Erre vezethető vissza, hogy a 25 és 300 mg/kg dimetoáttal mérgezett állatok vérének aktivitásában nem találtunk olyan különbséget, mint amilyen különbség van az alkalmazott dózisban.

Hasonló megfigyelést tettek *Westlake és mtsai* (24), valamint *Marosi és mtsai* (17), akik nem tapasztaltak dózisfüggő enzimbenítást dimetoáttal szájon át mérgezett japán fűrjéknél, illetve tengerimalacoknál.

A dimetoát és oxi származékának enzimbenítő hatásában (I_{50}) közel 3 nagyságrendbeli különbség van ($8,5 \times 10^{-3}$, illetve $1,1 \times 10^{-5}$), így a mért 70–80%-os inhibícióhoz elegendő, hogy a dimetoátnak csupán néhány %-a alakuljon át toxikus oxiszármazékká.

Az in vitro reaktiválási kísérletek azt bizonyították, hogy az in vivo benített vér és agyi ChE a vizsgált reaktivátorokkal jól reaktiválható. Az alkalmazott legnagyobb reaktivátor koncentrációval 35 (Toxogonin), illetve 36%-os (2-PAM) reaktiváló hatás érhető el a vér ChE-nél 30 perc múlva.

Az in vivo kísérletek eredményeiből (1. táblázat, 3., 4. kísérlet) számított reaktiváló hatás (1 óra: 41,3%; 2 óra: 50,5%; 3 óra: 32,4%; 4 óra: 33,3%; 5 óra: 17,3%) az első két órában magasabb, mint az in vitro kapott érték (35%), és a további két órában át is csak kismértékben esik ez alá. Ez csak azzal magyarázható, hogy Toxogonin a reaktiváló hatás mellett az enzim reverzibilis benítésával védi azt a dimetoxontól (profilaktikus hatás). Másik lehetséges magyarázat az lenne, hogy a Toxogonin koncentrációja a vérben nagyobb, mint 10^{-3} M. Ez pedig 25 mg/kg dózis esetén akkor lenne igaz, ha a beadott mennyiség csak a vérkeringésben lenne. Számítás szerint egy 200 g-os patkány vértérfogata 11,3 ml (26), így a Toxogonin koncentrációja $1,23 \times 10^{-3}$ M-nek adódna. A gyakorlatban a vér Toxogonin koncentrációja ezt az értéket meg sem közelíti (23), elosztási tere az egész víztér, és eliminációja gyors (felezési idő 26 perc).

Annak ellenére, hogy a reaktivátor több alkalommal került beadásra, a vér aktivitása folyamatosan csökkent.

Sem a nagyobb dózissal (50 mg/kg), sem a gyakoribb adással (11×10 mg/kg) nem lehetett aktivitás növekedést elérni, mint amelyet direkt hatású antikolinészteráz vegyületeknél megfigyeltek (5).

A jelenség feltételezésünk szerint farmakokinetikai folyamatokra vezethető vissza. Bár a tápcsatornába jutott mérgező anyag felszívódása viszonylag gyors, nagyobb mennyiség ingestiója esetén ez elhúzódik, és ennek következtében a metabolizáció is. A változatlan formában levő, illetve a metabolizáció során képződött toxikus anyag koncentrációja a keringésben egyre nő, míg a reaktivátor koncentrációja egy rövid emelkedő szakasz után csökkenést mutat. Noha a reaktivátor újabb bevitelével valamelyest szinten tartható egy ideig, a mérgező anyag koncentrációja, különösen a lassan ürülő dimetoxoné, tartósan magasabb lesz, mint a reaktivátoré. A tartósan magasabb koncentrációjú inhibitor a reaktivált vagy irreverzibilisen védett enzimet ismételtelen benítja, és ezért nem tapasztalható in vivo számottevő aktivitás növekedés a reaktivátor kezelés után.

A reaktiválás — ismételt benítés ciklusos reakció folyamatok eredőjét az inhibitor és a reaktivátor farmakokinetikája (felszívódás, metabolizáció, kiürülés), valamint a foszforillált enzim öregedési folyamata szabja meg. Súlyosabb mérgezés esetén, amikor a mérgező anyag koncentrációja tartósan magas, ennek hatása dominál.

Az *in vivo* és *in vitro* reaktiválási kísérletek az emelkedett ChE aktivitásán keresztül azt igazolták, hogy a reaktiválás biokémiai reakciója során nem képződik az eredeti antikolinesteráz vegyületnél potensebb inhibitor, mint ami pl. Szarin és Toxogonin vagy Szomán és Toxogonin, illetve TMB—4 kölcsönhatásában képződik, és további ChE aktivitáscsökkenést eredményez (8, 14, 19, 20).

Ez a kedvező hatás azonban nem mutatkozott meg az atropinnal együtt alkalmazott kombinált kezelésben. Mindhárom reaktivátor csökkentette az atropin terápiás hatását, amit egyrészt az állatok elhullásában számszerűen, másrészt az állatok állapotában megfigyeléssel tapasztalhattunk. Mivel a reaktivátorok alkalmazása során nem észleltük potensebb inhibitor képződését, a reaktivátorok kedvezőtlen hatása más okokra vezethető vissza.

Ezt a feltevést alátámasztja az *in vivo* reaktiválási kísérletekben az 50 mg/kg Toxogonin háromszori alkalmazása utáni tapasztalt teljes elhullás is. A harmadik órában mért 41%-os vér kolinesteráz aktivitás nem utal endogén acetilkolin mérgezésre. Az elhullott állatok agyi ChE aktivitása is valamelyest magasabb volt (23 nkat/g), mint amit 300 mg/kg dimetoát mérgezés után kaptunk (22, illetve 15 nkat/g), amely aktivitás mellett elhullást egyáltalán nem tapasztaltunk.

Nem nagy a valószínűsége annak sem, hogy az inhibitor és reaktivátor kölcsönhatásában olyan toxikus származék képződne, amely nem a ChE bénításon, hanem más mechanizmuson keresztül fejt ki hatását. Valószínűtlen, hogy a három eltérő szerkezetű reaktivátor ugyanolyan toxikus származékot képezne a dimetoáttal vagy annak valamilyen metabolitjával.

Marosi és mtsai (17) állatkísérletekben bebizonyították, hogy súlyos dimetoát intoxikációban szívelégtelenség okozza az elhullást, mely nem hozható összefüggésbe a ChE bénulásával. Ebből a dimetoát direkt kardiotoxikus hatására következtek, amelynek súlyossága viszont összefüggésbe hozható a szívizom dimetoát koncentrációjával. Ez a direkt toxikus hatás kezdetben funkcionális zavarokat okoz morfológiai elváltozás nélkül, de a mérgezés után 12—24 órával már morfológiai elváltozások is megfigyelhetők a szív izomzatában.

Az atropin kis- és közepes méregdózisoknál kivédi az acetilkolin túlsúly hatását, de nincs hatása a direkt kardiotoxikus effektusokra (25), amelyek ebben a dózisban még nem letálisak. A reaktivátorok mérsékelhetik az acetilkolin túlsúly kialakulását, de a kardiotoxikus effektusokra nincs, vagy ha van, kedvezőtlen lehet a hatásuk. Lehetséges azonban, hogy a reaktivátorok nem a direkt kardiotoxikus hatásokat befolyásolják károsan, hanem más mechanizmuson keresztül hatnak. Nem hagyható figyelmen kívül, hogy a reaktivátorok is toxikus vegyületek (LD₅₀ 180—220 mg/kg), és bár ennél lényegesen kisebb dózisban kerültek alkalmazásra, a fiziológiás egyensúlyból erősen kibillentett biológiai rendszer állapotát kedvezőtlen irányban befolyásolhatják.

Kedvező (reaktíváló) hatásukat ugyanakkor a mérgező anyag tartós jelenléte miatt csak ideiglenesen tudják kifejteni.

Az *in vivo* terápiás kísérletek azt bizonyították, hogy dimetoát mérgezésben az atropin monoterápia adja a legjobb eredményt. Az atropint reaktivátorral kombinálva csökken a hatás. Az atropin hatásossága sem túl nagy (terápiás index 1,6), mivel súlyosabb intoxikációban a dimetoátnak egyéb toxikus hatása is jelentkezik, melyet az atropin nem befolyásol.

A reaktivátorok kezdeti hatása kedvező, de a későbbiekben a keringésben tartósan jelen levő inhibitor ezt a hatást megszünteti, és a reaktivátornak csak a toxikus hatása érvényesül, ezért dimetoát mérgezésben reaktivátor adása ellenjavallt.

1. Chamberlain V. F. és mtsai: J. Econ. Entom. 1961, 54, 733
2. Dauterman V. C. és mtsai: Agr. Food. Chem. 1959, 7, 188
3. Erdmann W. D.: in medical protection against chemical warfare agents, sipri, Stockholm 1976, p.
4. Finney D. J.: Probit analysis 3rd. ed. Cambridge, 1971
5. Gough B. J., Schellenberger T. E.: Drug. Chem. Toxicol. 1977—78, 1, 25.
6. Gulyás L., Zsiga I.: Honvédervos 1977, 29, 29.
7. Gulyás L. és mtsai: Honvédervos 1978, 30, 33.
8. Hackley és mtsai: Arch. Biochem. Biophys. 1959, 80, 211.
9. Kaplanis és mtsai: J. Econ. Entom. 1959, 52, 1190.
10. Kisielinski I. és mtsai: in medical protection against chemical warfare agents, sipri Stockholm, 1976, p. 117.
11. Kovách A.: A Kísérletes Orvostudomány Vizsgáló Módszerei, Akad. Kiad. Budapest, 1954, I. k. p. 104
12. Kiss Z., Fazekas T.: Orv. Het. 1978, 119, 1905.
13. Kiss Z.: Szívritmuszavarok Heveny Kolinészterázbenítő és Bárium Mérgezésben Kand. Ért. Szeged, 1981.
14. Lamb J. C. és mtsai: Biochem. Biophys. Acta 1964, 89, 174.
15. Lundi P. M., Tremblay K. P.: Eur. J. Pharmacol. 1979, 60, 47.
16. Marosi Gy. és mtsai: Népegészségügy 1985, 66, 14
17. Marosi Gy. és mtsai: Arch. Toxicol. 1985, 57, 142
18. Máté L.: Honvédervos 1980, 32, 97
19. Nenner M.: Biochem. Pharmacol. 1974, 23, 1255.
20. Rogne O.: Biochem. Pharmacol. 1967, 16, 1853.
21. Sanderson D. M., Edson E. F.: Brit J. Ind. Med. 1964, 21, 52
22. Uchida T. és mtsai: Agr. Food Chem. 1964, 12, 48
23. Vojvodic V., Boskovic B.: in medical protection against chemical warfare agents, siori Stockholm, 1976, p. 65.
24. Westlake G. E. és mtsai: J. Agr. Food Chem. 1981, 29, 772
25. Wolthuis O. L., Meeter E.: Eur. J. Pharmacol. 1968, 2, 387
26. Zech R. és mtsai: Arzneim. Forsch. 1967, 17, 1196.
27. Zsiga I. és mtsai: Honvédervos 1978, 30, 269

Подполковник м/с Л. Мате. И. Вольф:

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕАКТИВАТОРОВ ХОЛИНЕСТЕРАЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ ДИМЕТОАТОМ

Литературные данные об эффективности реактиваторов при отравлении диметоатом противоречивы. Авторами проведены опыты для выяснения данной проблемы. Было установлено, что в условиях *in vitro* 2—ПАМ, Токсогонии и HI—6 эффективно реактивирует ингибированную *in vivo* холинэстеразу крови и мозга. Реактивирующий эффект может быть выявлен и при применении реактиваторов *in vivo*. Однако, в комбинации с атропином, реактиваторы уменьшают терапевтический эффект холинолитика, и поэтому назначение исследованных реактиваторов при отравлении диметоатом противопоказано.

Lt. col. L. Máté M. C., I. Wolf:

EFFICACY OF CHOLINESTERASE REACTIVATORS IN EXPERIMENTAL DIMETHOATE INTOXICATION

In the literature there are contradictory views on the efficacy of enzyme reactivator in intoxication caused by cholinesterase inhibiting dimethoate. The present study was carried out to elicit this problematic issue. The authors have established that 2-PAM, Toxogonine and HI—6 used *in vitro* reactivate blood and brain cholinesterase inhibited *in vivo*. Enzyme reactivating effect of reactivators can be demonstrated also *in vivo*. But reactivators applied in combination with atropine reduced the therapeutic effect of cholinolytics. Thus the reactivators involved in this study are contraindicated in intoxication caused by dimethoate.