

**Marek Brytan*, Radosław Kalinowski*, Małgorzata Paluch*,
Marek Kowalczyk***

**SYMULACJA ZMIAN AKTYWNOŚCI ACETYLOCHOLINOESTERAZY
W PRZEBIEGU ZATRUCIA ZWIĄZKAMI FOSFOROORGANICZNYMI
U LUDZI Z WYKORZYSTANIEM DYNAMICZNEGO MODELU *IN VITRO***

**SIMULATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY CHANGES
IN ORGANOPHOSPHATE POISONING IN HUMANS USING DYNAMIC
IN VITRO MODEL**

Słowa kluczowe: acetylocholinoesteraza, związki fosforoorganiczne, oksymy, zatrucie.

Key words: acetylcholinesterase, organophosphates, oximes, poisoning.

In the experiment, an in vitro dynamic model that simulates toxico- and pharmacodynamic processes in living organisms was used. This model enables changes of organophosphate and drug concentrations in the reaction environment and allows for measurement of AChE activity in real time.

There was performed a simulation of percutaneous exposure to $5xLD_{50}$ of S-[2-(diisopropylamino)ethyl]-O-ethyl methylphosphonothioate (VX) and treatment by intramuscular injection of 250 mg obidoxime simultaneously with or 40 minutes after exposure. The concentration-time relationship for obidoxime was taken from literature data concerning clinical trials on humans. The relationship for VX was taken from experiments on guinea pigs. The AChE activity was monitored for four hours.

The obtained results facilitate the estimation of the effectiveness of specific antidotes used in organophosphate poisoning in humans and may be a basis for optimization of treatment regimen. The developed model might be used in complex analyses of other enzyme – inhibitor systems.

* *Dr Marek Brytan, dr inż. Radosław Kalinowski, mgr Małgorzata Paluch, prof. dr hab. n. med. Marek Kowalczyk – Zakład Farmakologii i Toksykologii, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa; tel.: 22 681 61 56; e-mail: m.brytan@wihe.waw.pl*

1. WPROWADZENIE

Wobec istnienia zagrożenia użyciem wysokotoksycznych związków fosforoorganicznych w atakach terrorystycznych lub działaniach wojennych podejmuje się próby opracowania skutecznych metod leczenia zatruc tymi związkami. Stosowany od wielu lat schemat leczenia obejmuje podawanie atropiny oraz reaktywatorów acetylocholinoesterazy (dalej AChE) – związków z grupy oksymów.

Do oceny skuteczności nowych oksymów w reaktywacji AChE wykorzystuje się zarówno badania *in vitro*, jak i *in vivo*. Badania *in vitro* pozwalają na wstępne określenie skuteczności oksymów, ale nie uwzględniają złożonych procesów toksyko- i farmakokinetycznych układu AChE – inhibitor – reaktywator.

Ekstrapolacja wyników badań z wykorzystaniem modelu zwierzęcego w odniesieniu do ludzi jest utrudniona ze względu na istotne różnice międzygatunkowe w toksyko- i farmakokinetyce oraz dawkowaniu badanych związków [Baggot 1994]. Alternatywą dla powyższych rozwiązań jest stworzenie dynamicznego modelu *in vitro*, który umożliwiłby symulację procesów toksyko- i farmakokinetycznych, zachodzących u człowieka i innych gatunków zwierząt. Pomiar aktywności AChE w czasie rzeczywistym podczas dynamicznej zmiany stężeń badanych substancji w środowisku reakcji pozwoliłby na ocenę skuteczności oksymów bez konieczności użycia dużej liczby zwierząt w doświadczeniach, oraz uniknięcie błędów wynikających z ekstrapolacji wyników na inne organizmy żywe.

Celem niniejszej pracy było wykazanie przydatności opracowanego i zwalidowanego przez nasz zespół badawczy dynamicznego modelu *in vitro* w ocenie skuteczności stosowania oksymów w zatruciu związkami fosforoorganicznymi.

2. MATERIAŁ I METODY

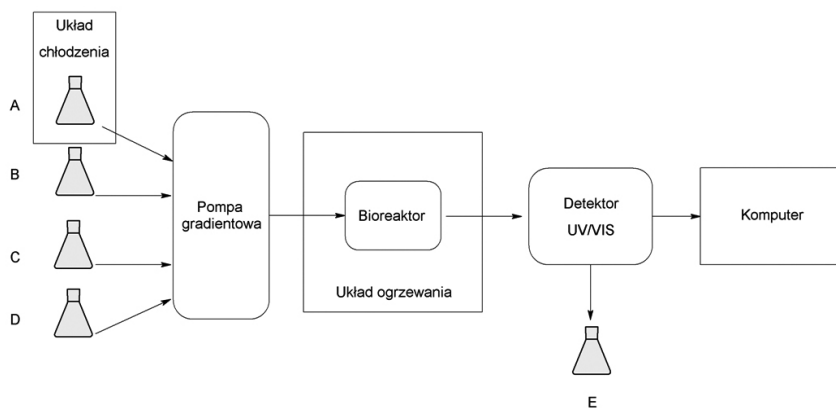
2.1. Odczynniki

Wszystkie odczynniki stosowane w doświadczeniach przygotowano z użyciem buforu fosforanowego o pH 7,4. Metylotiofosfonian O-etylo-S-(2-diizopropylamino)etylu (dalej VX) pozyskano z Wojskowego Instytutu Chemii i Radiometrii w Warszawie. W badaniach stosowano roztwór VX o stężeniu 10 nM. Acetylocholinostazę – AChE z ludzkich krwinek zakupiono w Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań. W badaniach stosowano roztwór AChE o aktywności 16,4 U/ml. Roztwór obidoksyumu o stężeniu 100 mg/l przygotowywano z preparatu Toxogonin 250 mg, amp. 1 ml, (Merck, Darmstadt). Odczynnik do pomiaru aktywności AChE metodą Ellmana przygotowano wykonując roztwór 5 mM jodku acetylotiocholiny (ATChI) oraz 3 mM kwasu 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesowego (DTNB), Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań.

2.2. Układ badawczy

Układ badawczy zbudowano z trzech modułów: bioreaktora przepływowego, czterokanałowej pompy gradientowej HPLC oraz detektora UV-VIS HP1050 (rys.1). Zasadniczym elementem bioreaktora był filtr membranowy z regenerowanej celulozy Millipore o średnicy 25 mm i wymiarach porów 30 kDa, umieszczony w stalowej obudowie, na którym osadzano enzym. Do bioreaktora dostarczano odczynniki ze stałą sumaryczną prędkością przepływu 1 ml/min. Stężenie poszczególnych odczynników w bioreaktorze modyfikowano przez zmianę ich udziału objętościowego w mieszaninie podczas dozowania. Bioreaktor był umieszczony w łaźni wodnej o temp. $37^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Odczynniki opuszczające bioreaktor były kierowane do detektora, gdzie rejestrowano absorbancję produktów reakcji, charakterystycznych dla metody Ellmana. W celu określenia absorbancji tła stworzono dodatkowy obwód umożliwiający przepływ odczynników przez detektor z pominięciem bioreaktora.

Odczynnik Ellmana umieszczono w zaciemnionym naczyniu chłodzonym lodem, w celu zmniejszenia szybkości reakcji hydrolizy AChE i zabezpieczenia DTNB przed fotodegradacją. Roztwór obidoksymu, VX oraz bufor fosforanowy dozowano w temperaturze pokojowej.



Rys. 1. Schemat układu badawczego: A – odczynniki Ellmana, B – bufor fosforanowy, C – VX, D – obidoksym, E – odpływ

Fig. 1. Scheme of the experimental system: A – Ellman reagents, B – phosphate buffer, C – VX, D – obidoxime, E – effluent

Przed rozpoczęciem właściwej analizy bioreaktor wypełniono buforem fosforanowym i rozpoczęto rejestrację absorbancji. Po 20 minutach rozpoczęto dozowanie odczynnika Ellmana, a po kolejnych 10 minutach wprowadzono do bioreaktora roztwór AChE. Enzym umieszczono w bioreaktorze poprzez nastrzyknięcie do pętli iniektora HPLC 20 μl roztworu AChE.

Po wprowadzeniu enzymu do bioreaktora układ wymagał stabilizacji przez ok. 60 minut. Po okresie stabilizacji rozpoczęto właściwą analizę, uruchamiając program automatycznego dozowania odczynników (tab. 1). Udział objętościowy odczynników w mieszaninie reakcyjnej ulegał płynnej liniowej zmianie pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi. Aktywność enzymu monitorowano przez 4 godziny.

Tabela 1. Schemat dozowania odczynników – symulacja jednoczesnej przezskórnej ekspozycji na VX i domięśniowego podania obidoksymu

Table 1. The reagent dosing scheme – simulation of simultaneous exposure to VX and intramuscular injection of obidoxime

Etapy doświadczenia	Czas (min)	Udział objętościowy dozowanych odczynników (%)			
		bufor fosforanowy	odczynniki Ellmana	VX	obidoksym
Przygotowanie bioreaktora	0 – 20	100,0	–	–	–
	20 – 30	90,0	10,0	–	–
Stabilizacja układu	30 – 90	90,0	10,0	–	–
Analiza	0	90,0	10,0	0,0	0,0
	5	83,0	10,0	1,9	5,1
	10	77,6	10,0	3,7	8,7
	20	70,0	10,0	7,2	12,8
	30	65,2	10,0	10,3	14,5
	40	61,9	10,0	13,2	14,9
	50	59,6	10,0	15,8	14,6
	60	57,9	10,0	18,2	13,9
	70	56,5	10,0	20,4	13,1
	80	55,5	10,0	22,3	12,2
	90	54,6	10,0	24,1	11,3
	100	53,9	10,0	25,7	10,4
	120	52,8	10,0	28,3	8,9
	140	52,1	10,0	30,4	7,5
	160	51,6	10,0	32,0	6,4
	180	51,5	10,0	33,1	5,4
200	51,5	10,0	33,9	4,6	
220	51,8	10,0	34,3	3,9	
240	52,2	10,0	34,5	3,3	

2.3. Symulacja ekspozycji na działanie związku fosforoorganicznego i leczenia

W doświadczeniu przeprowadzono symulację ekspozycji przezskórnej u ludzi na VX w dawce $5 \times LD_{50}$ oraz leczenia przez jednorazowe domięśniowe podanie obidoksymu w dawce 250 mg w chwili zatrucia lub 40 minut po ekspozycji. Zależność stężenie–czas dla obidoksymu (rys. 2) określono wykorzystując równanie Batemana:

$$c = D \cdot k_a \frac{e^{-k_e t} - e^{-k_a t}}{V_d \cdot (k_a - k_e)} \quad (1)$$

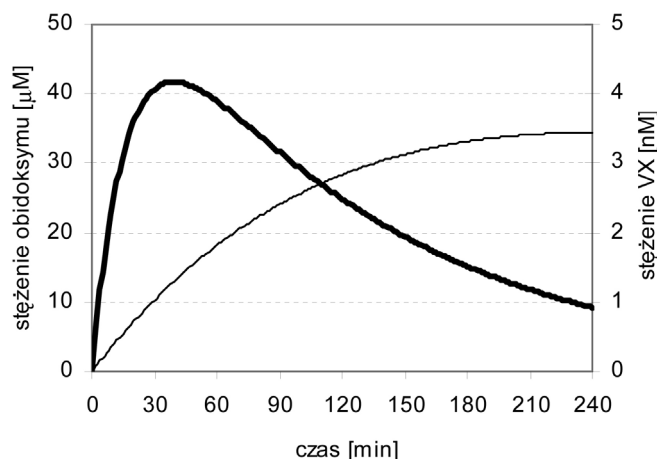
gdzie: c – stężenie (μM),
 t – czas (min),
 D – dawka ($\mu\text{mol/kg}$),
 V_d – objętość dystrybucji (l/kg),
 k_a – stała szybkości absorpcji (min^{-1}),
 k_e – stała szybkości eliminacji (min^{-1}).

Dawka obidoksymu $D = 10 \mu\text{mol/kg}$ odpowiada standardowej domięśniowej dawce $250 \text{ mg}/70 \text{ kg}$ masy ciała. Wartość objętości dystrybucji $V_d = 0,173 \text{ l/kg}$ przyjęto na podstawie [Sidell i in. 1972]. Wartość stałej szybkości absorpcji nie jest znana dla tego oksymu, więc przyjęto taką jak dla HI-6 – $k_a = 0,0578 \text{ min}^{-1}$ [Clement i in. 1995], zakładając podobną kinetykę absorpcji związków, które są strukturalnie podobne. Wartość $k_e = 0,0083 \text{ min}^{-1}$ przyjęto z Sidell i Groff [1970].

Zależność stężenie – czas dla VX (rys. 2), ze względu na oczywisty brak danych dotyczących badań u ludzi, ustalono na podstawie danych literaturowych dotyczących doświadczeń na świnkach morskich [Van der Schans i in. 2003], wykorzystując równanie:

$$c = c_0 \cdot \exp(-k_e \cdot t) - c_0 \cdot \exp(-k_a \cdot t) \quad (2)$$

W równaniu (2) przyjęto $k_a = 0,005005$ oraz $k_e = 0,003375$. Wartość $c_0 = 23,92 \text{ nM}$ ustalono na podstawie liniowej ekstrapolacji danych literaturowych od $1 \times \text{LD}_{50}$ do $5 \times \text{LD}_{50}$.



Objaśnienie: — obidoksym, — VX.

Rys. 2. Krzywe stężenie – czas dla VX i obidoksymu

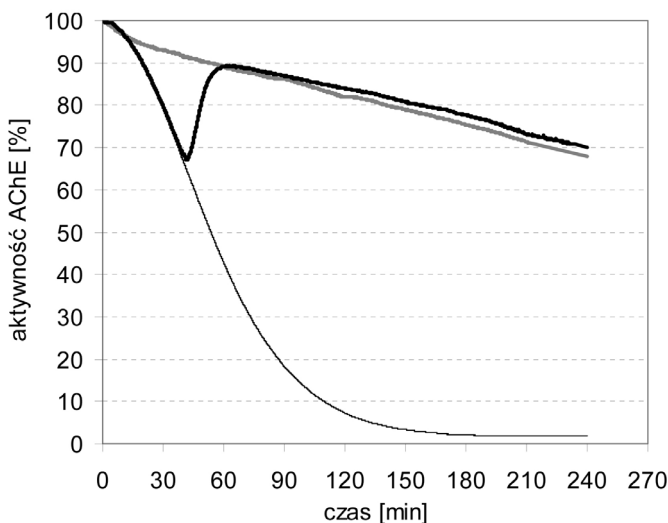
Fig. 2. The concentration – time curves for VX and obidoxime

3. WYNIKI

Podczas symulacji ekspozycji na VX bez podania obidoksymu zaobserwowano stopniowy spadek aktywności AChE o 33,3% w 40 minucie i 98,1% w 240 minucie analizy (rys.3).

Biorąc pod uwagę istniejącą ścisłą korelację pomiędzy stopniem inhibicji enzymu oraz stanem klinicznym zatrutego osobnika, można na podstawie uzyskanych danych określić czas wystąpienia pierwszych objawów zatrucia i dalszy przebieg stanu klinicznego u ludzi. Podczas symulacji jednoczesnego podania VX oraz obidoksymu zaobserwowano spadek aktywności AChE o 8,4% w 40 minucie i 32,0% w 240 minucie.

Podczas analizy, w której dozowanie obidoksymu rozpoczęto w 40 minucie (w chwili, kiedy prawdopodobnie wystąpią już objawy zatrucia), zaobserwowano szybki wzrost aktywności AChE wraz ze wzrastającym stężeniem obidoksymu. W 63 minucie analizy aktywność AChE osiągnęła wartość maksymalną 89,2%, a następnie stopniowo zmniejszyła się do 70,1% w 240 minucie.



Objaśnienie: — VX, — VX + obidoksym (t0=0 min), — VX + obidoksym (t0=40 min).

Rys. 3. Wyniki symulacji aktywności AChE u ludzi po ekspozycji na VX ($5xLD_{50}$, p.c.) i jednorazowym podaniu obidoksymu (250 mg, i.m.) w chwili ekspozycji i w 40 minucie po ekspozycji

Fig. 3. Results of AChE activity simulations in humans after exposure to VX ($5xLD_{50}$, p.c.) and administration of obidoxime (250 mg, i.m.) simultaneously with or 40 minutes after exposure

4. PODSUMOWANIE

Do badań wytypowano VX, związek fosforoorganiczny tworzący kompleks z AChE podatny na reaktywację przez obidoksym. Kompleks VX z AChE charakteryzuje długi czas po-

łowicznego starzenia (ok. 50 godz.), co pozwalało na zaobserwowanie reakcji reaktywacji enzymu przez cały okres trwania analizy oraz ułatwiało interpretację wyników.

W symulacji ustalono dawkę VX wynikającą z założeń taktycznych, w których przyjmuje się, że w wyniku ataku z użyciem związków fosforoorganicznych, większość populacji będzie narażona na dawki nie wyższe niż $5 \times LD_{50}$ [Dunin i in. 1989].

W badaniach określono skuteczność obidoksymu po podaniu w chwili ekspozycji, czyli odtworzono warunki typowego zwierzęcego modelu doświadczalnego. Podobną analizę przeprowadzono symulując warunki rzeczywiste, kiedy leczenie zostanie zastosowane dopiero po wystąpieniu objawów zatrucia. Uzyskane wyniki pozwalają na precyzyjne określenie sposobu dawkowania oksymów w zatruciu związkami fosforoorganicznymi, szczególnie w sytuacji, kiedy nie ma możliwości monitorowania aktywności AChE u osób zatrutych.

Należy podkreślić, że podstawowym warunkiem wykorzystania opisywanego modelu doświadczalnego jest dostępność danych toksyko- i farmakokinetycznych badanych związków.

Głównym ograniczeniem w zastosowaniu modelu jest brak danych toksykokinetycznych dotyczących bojowych środków trujących u ludzi. W ograniczonym zakresie można zastąpić je danymi ekstrapolowanymi z badań na szczurach lub świnkach morskich albo wykorzystać dostępne dane dotyczące toksykokinetyki pestycydów fosforoorganicznych pochodzące z badań przeprowadzonych na ochotnikach [Bouchard M. i in. 2003; Meaklim i in. 2003].

Podsumowując, opisany model badawczy pozwala na oszacowanie skuteczności stosowania oksymów oraz optymalizację sposobu dawkowania w leczeniu zatruc związkami fosforoorganicznymi z grupy pestycydów oraz bojowych środków trujących. Model ten można wykorzystać również do złożonych analiz innych układów enzym – inhibitor.

PIŚMIENICTWO

- BAGGOT J.D. 1994. Application of interspecies scaling to the bispyridinium oxime HI-6. *American Journal of Veterinary Research* 55: 689–691.
- BOUCHARD M., GOSSELIN N., BRUNET R., SAMUEL O., DUMOULIN M.J., CARRIER G. 2003. A toxicokinetic model of malathion and its metabolites as a tool to assess human exposure and risk through measurements of urinary biomarkers. *Toxicological Sciences* 73: 182–194.
- CLEMENT J.G., BAILEY D.G., MADILL H.D., TRAN L.T., SPENCE J.D. 1995. The acetylcholinesterase oxime reactivator HI-6 in man: pharmacokinetics and tolerability in combination with atropine. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 16: 415–425.
- DUNN M.A., SIDELL F.R. 1989. Progress in medical defense against nerve agents. *Journal of the American Medical Association* 262: 649–652.
- MEAKLIM J., YANG J., DRUMMER O.H., KILLALEA S., STAIKOS V., HOROMIDIS S., RUTHERFORD D., IOANNIDES-DEMOS L.L., LIM S., MCLEAN A.J., MCNEIL J.J.

2003. Fenitrothion: toxicokinetics and toxicologic evaluation in human volunteers – Research. *Environmental Health Perspectives* 111: 305–308.
- SIDELL F.R., GROFF W.A. 1970. Toxogonin: blood levels and side effects after intramuscular administration in man. *Journal of Pharmacological Sciences* 59: 793–797.
- SIDELL F.R., GROFF W.A., KAMINSKIS A. 1972. Toxogonin and pralidoxime: kinetic comparison after intravenous administration to man. *Journal of Pharmacological Sciences* 61: 1765–1769.
- VAN DER SCHANS M.J., LANDER B.J., VAN DER WIEL H., LANGENBERG J.P., BENSCHOP H.P. 2003. Toxicokinetics of the nerve agent (+/-)-VX in anesthetized and atropinized hairless guinea pigs and marmosets after intravenous and percutaneous administration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 191: 48–62.