

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XXXVII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 14.

Urednik

PAVEL ŠTERN,

**redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine**



SARAJEVO

1969

KAMENKO BRANKOV, BOGDAN BOŠKOVIĆ i SEID HUKOVIĆ

UTICAJ HOLINOLITIKA NA EFEKAT ANTIHOLINESTEROZA IN VITRO*

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 1. IV 1969. g.)

U V O D

Ispitivanje holinolitika, reaktivatora i spazmolitika u odnosu na spazam raznih organa in vitro može da ukaže na uspešno lečenje ljudi otrovanih antiholinesterazama.¹⁻⁴ Na osnovu eksperimenata na izolovanim organima može da se utvrdi adekvatnija upotreba atropina, oksima i drugih holinolitika.^{5,6}

Intoksikacije nekim antiholinesterazama, kao što su soman, tabun i OMPA ne mogu se lako modifikirati sa reaktivatorima i holinolicima.^{1,4,7} Prema Fleisher-u i Haris-u,⁸ uzrok neefikasnosti se tumači »starenjem« kombinacije enzim-inhibitor i deaktivacijom jednog radikala fosforilisanog enzima. Bošković i sar.⁹ smatraju da, pored procesa »starenja«, važnu ulogu imaju i sterične smetnje koje onemogućavaju da oksim efektivno reaktivira inhibisanu antiholinesterazu somanom.

Cilj ovoga rada je da se ispita in vitro delovanje holinolitika, spazmolitika i reaktivatora na obe vrste holinesteraza, tj. na one kod kojih je proces »starenja« brz i na one antiholinesteraze gde je proces »starenja« spor. Kod antiholinesteraza sa »sporim starenjem« inhibisana holinesteraza se može relativno lako reaktivirati oksimima.

Kao model-sistem transmisije helinergični nerv acetilholin glatko-mišićni organ uzeta je u ovom radu izolovana mokraćna bešika pacova sa pripadajućim pelvičkim nervom. Na ovom model-sistemu su ispitivani efekti antiholinesteraze i njihovi modifikatori. Upotrebljene su sledeće supstance: parasimpatikomimetici 1. acetilholin, 2. neostigmin, 3. soman, 4. medemo, 5. metilfluorofosforilholin, parasimpatikolitici i reaktivatori, 6. atropin, 7. karamifen, 8. benaktizin, 9. TMB-4 i njihove kombinacije.

METODA

Pacov se ošamuti i dekapitira. Životinja se položi na leđa i fiksira. Napravi se laparatomija, prereže simfiza i razvuku zdelične kosti. Uzima se mokraćna bešika pacova sa granama holinergičnog pelvičkog nerva,

* Izrada ovog rada je potpomognuta od strane Republičkog fonda za naučnoistraživački rad.

kako je opisano ranije.¹⁰ Mokraćna bešika je suspendovana u posudu za izolovane organe zapremine 20 ml. U posudi se nalazi rastvor po Tyrodeu. Temperatura rastvora je $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Kroz otopinu se puštaju mehurići kiseonika. Za mešanje rastvora upotrebljava se specijalna pumpa koja ujedno služi kao vibrator.

Parametri električnog stimulusa su submaksimalne jačine 10 V, frekvence 30/sek, dužina pojedinačnog impulsa je 2 msek. Trajanje stimulacije je 2 sekunde. Pelvički nerv se stimuliše svake minute. Period stabilizacije iznosi 30 minuta.

Prvo se registruje 5 do 10 kontrolnih kontrakcija. Zatim se dodaju ispitivane supstance i registruju se modifikacije visine kontrakcije. Posmatra se takođe promena tonusa detrusora bešike, odnosno promena bazalne linije. Procenat povećanja ili smanjenja kontrakcije se izračunava u odnosu na kontrolne kontrakcije.

Koncentracije su uzete kao soli, osim ako nije drugačije označeno. Upotrebene su sledeće supstance: *soman* (pinakol-metilfosfonofluorodati), *medemo* (etoksi-2-dimetilaminoetil-tiometil-fosfin oksid), *metilfluorofosforilholin* iodid, *neostigmin* bromid, *atropin* sulfat, *karamifen* hidrohlorid, *benaktizin* hidrohlorid i TMB-4 [1, 3, bis (piridin-4-aldoxi) propaniodid].

REZULTATI

A. Uticaj električne stimulacije holinerhičnih nerava

a. Konstantne električne stimulacije nerava dovode do ravnomernih kontrakcija detrusora mokraćne bešike pacova.

b. Izazvane kontrakcije su mikcione kontrakcije i mogu se ponavljati nekoliko sati ukoliko se stimulišu svake minute ili najviše svakih 30 sekundi.

c. Razne supstance vrlo lako menjaju efekat električne stimulacije nerva.

B. Uticaj pojedinih supstanci na efekat električne stimulacije holinergičnog nerva

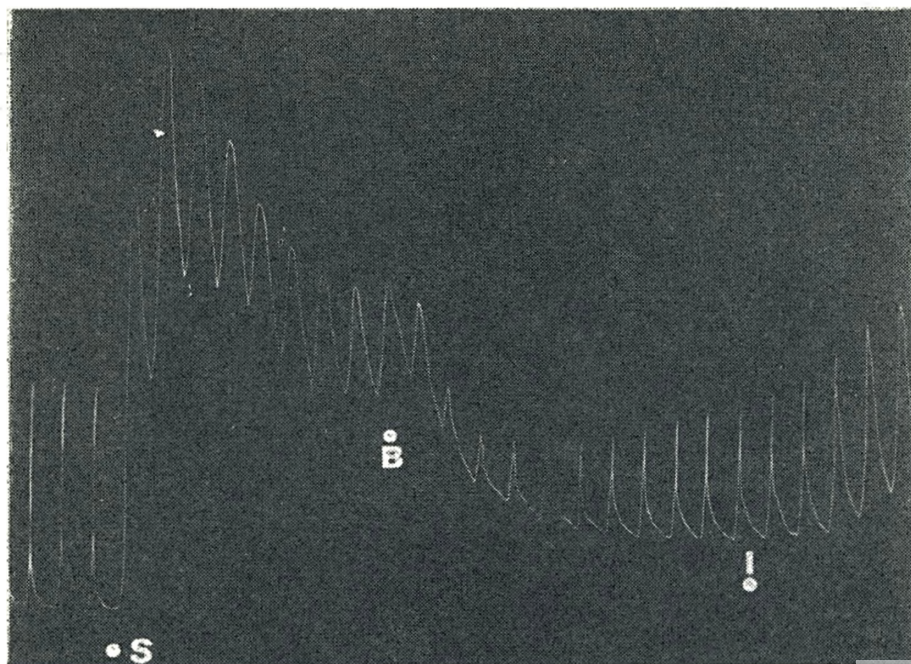
a) Uticaj antiholinesteraza i acetilholina

Antiholinesteraze dovode do povećanja efekta stimulacije pripadajućeg nerva. Povećane su apsolutne visine izazvanih kontrakcija i tonus detrusora.

1. *Soman* u koncentraciji 10^{-7} do 10^{-6} M ne dovodi do promene tonusa. Efekat stimulacije je, naprotiv, jako povećan. Nakon stimulacije nerva dolazi do kontrakcije 2—3 puta veće od kontrolne kontrakcije. Tonus bešike se jako povećava i dolazi do spastičnih mikcionih kontrakcija, ali tek nakon stimulacije nerva (Sl. 1).

2. *Medemo* u koncentraciji od 10^{-7} do 10^{-6} M povećava efekat stimulacije nerva. Nakon stimulacije nerva i izazvanih mikcionih kontrakcija dolazi do spazma i povećanja tonusa detrusora bešike.

3. *Metilfluorofosforilholin* u koncentraciji manjoj od 10^{-4} M ne dovodi do izrazitog povećanja efekta stimulacije. Efekat stimu-



Slika 1.

Izazvane submaksimalne mikcione kontrakcije izolovane mokraćne bešike pacova. Stimulacija nerva sa 30 Hz, 1 mSek., svake minute u trajanju od 2 sek. Kod tačke S dodat soman (10^{-6} M). Kod tačke B dodat benaktizin (10^{-9} M). Kod zadnje tačke ispiranje



lacije se povećava 2—3 kada je koncentracija 10^{-3} M. U koncentraciji 10^{-4} do 10^{-3} M povećava tonus detrusora, ali tek nakon stimulacije nerva.

4. Neostigmin u koncentraciji 10^{-5} M dovodi do povećanja spazma i izazvanih kontrakcija. Povećanje spazma detrusora pojavljuje se nezavisno od stimulacije nerva, tj. efekat je sličan acetilholinu.

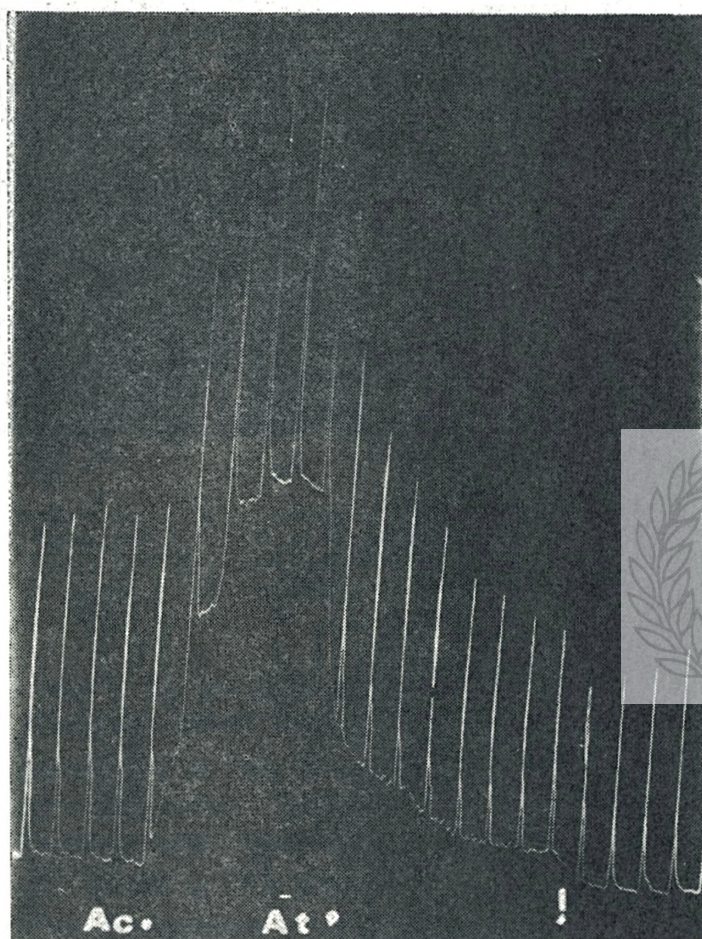
5. Acetilholin u koncentraciji 10^{-5} M dovodi do povećanja spazma i izazvanih kontrakcija. Povećanje spazma nije zavisno od istovremene stimulacije nerva, mada je pomenuto povećanje tonusa detrusora veće nakon 2—3 izazvane kontrakcije. Spazam koji se javlja nakon acetilholina ne utiče na relativnu visinu izazvanih kontrakcija, tj. mišić istiskuje isti ili povećani volumen iz mokraćne bešike, za razliku od svih antiholinesteraza gde se registruju spazam i smanjena funkcija bešike (Sl. 2).

b) Uticaj holinolitika

Holinolitici smanjuju izazvane kontrakcije, tj. smanjuju efekat stimulacije holinergičnog pelvičnog nerva i spuštaju bazalnu liniju.

1. Atropin smanjuje izazvane kontrakcije mokraćne bešike. U koncentraciji 10^{-6} M dovodi do smanjenja kontrakcije za 50% kontrolne vrednosti.

2. Karamifen smanjuje izazvane kontrakcije za 50% u koncentraciji 10^{-7} M. Za razliku od atropina karamifen deluje intenzivnije na izazvane mikcione kontrakcije.

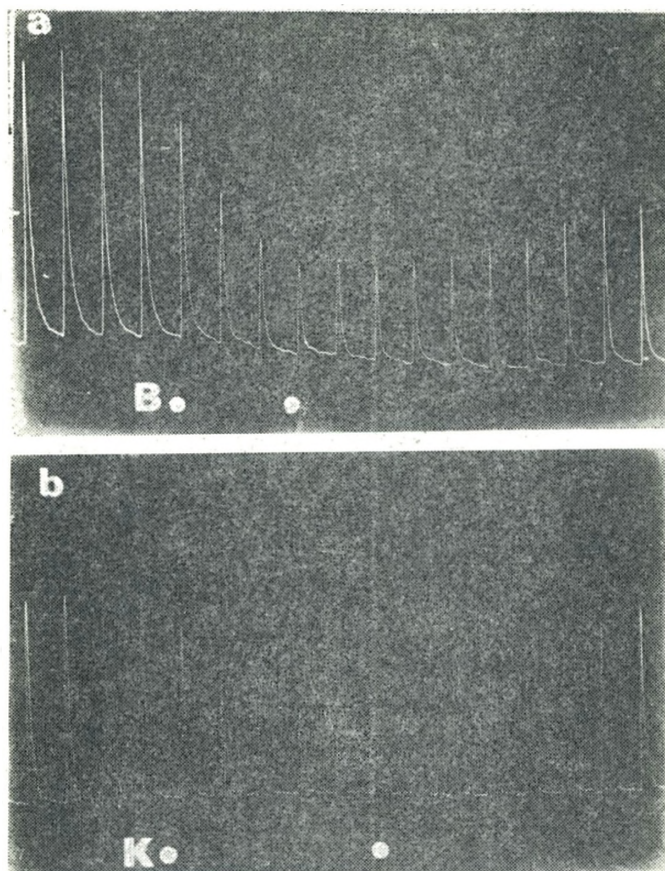


Slika 2.

Izazvane submaksimalne mikcione kontrakcije izolovane mokraćne bešike pacova. Stimulacija nerva sa 30 Hz, 1 mSek., svake minute u trajanju 2 sek. Kod tačke Ac dodat acetilholin (10^{-5}). Kod tačke At dodat atropin (10^{-7} M). Kod zadnje tačke ispiranje.

3. Benaktizin takođe smanjuje visinu kontrakcija u koncentraciji 10^{-7} M. Rezistencija efekta stimulacije nerva na mokraćnoj bešici prema atropinu je daleko veća od rezistencije prema benaktizinu.

4. T M B-4 takode deluje spazmolitički i holinolitički. Efekat stimulacije holinergičnog nerva smanjuje se za 50% u koncentraciji 10^{-3} M (Sl. 3).



Slika 3.

Izazvane submaksimalne mikcione kontrakcije izolovane mokraćne bešike pacova. Stimulacija nerva 30 Hz, 1 mSek., svake minute u trajanju od 2 sek.

a) Kod tačke B dodat benaktizin (10^{-7} M). Kod druge tačke ispiranje.

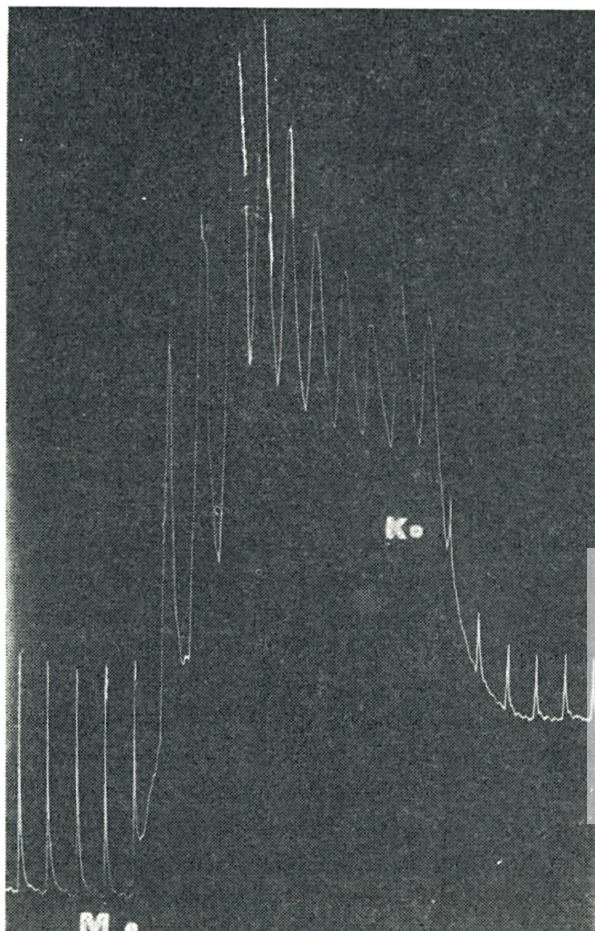
b) Kod tačke K dodat karamifen (10^{-7}). Kod druge tačke ispiranje.

C. Uticaj holinolitika na kontrakcije mokraćne bešike posle antiholinesteraza i acetilholina

Svi upotrebljeni holinolitički smanjuju spazam mokraćne bešike posle antiholinesteraza i acetilholina. Neki od njih prvih 1—5 minuta snažno smanjuju ili potpuno blokiraju efekat stimulacije (Sl. 4).

1. Atropin u koncentraciji 10^{-7} M smanjuje tonus u svim eksperimentima. Naročito jako deluje na organe tretirane sa medemo i acetilholinom. Najslabije atropin deluje na organe prethodno tretirane somanom.

2. Karamifen u koncentraciji 10^{-8} M smanjuje tonus i izazvane kontrakcije. Naročito spazmolitički deluje na spazam izazvan organofosornim antiholinesteraznim jedinjenjima.



Slika 4.

Izazvane submaksimalne mikcione kontrakcije izolovane mokraćne bešike pacova. Stimulacija 30 Hz, 1 mSek., svake minute u trajanju od 2 sek. Kod tačke M dodat metilfluorofosforilholin (10^{-3} M). Kod tačke K karamifen (10^{-8} M).

3. Benaktizin u koncentraciji 10^{-10} do 10^{-9} M smanjuje spazam i izazvane kontrakcije (Sl. 1). Spada među najjače holinolitičke. Naročito jako deluje na organe otrovane antiholinesterazima, izuzev somana. Efekat kod otrovanja somanom je ipak 10—100 puta jači od drugih holinolitičkih upotrebljenih u ovom eksperimentu.

4. TMB-4 takođe deluje holinolitički i spazmolitički. Najjače deluje spazmolitički kod medemo i metilfluorofosforilholina, i to u koncentraciji 10^{-5} M.

Tabela 1.

SPAZMOLITIČKI EFEKAT HOLINOLITIKA NA IZOLOVANU INERVISANU
MOKRAČNU BEŠIKU PACOVA PRE I POSLE ANTIHOLINESTERAZA

Približne mol. ekvipotentne konc. spazmolitika

Antiholinesteraze	Atropin	Karamifen	Benaktizin	TMB-4
Kontrola	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻³
Soman 10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁴
Medemo 10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁵
Metilfluorofosforilholin 10 ⁻³	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁵
Neostigmin 10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁴
Acetilholin 10 ⁻⁵	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁹	10 ⁻⁴

DISKUSIJA

Antiholinesteraze izazivaju povećanje spazma i smanjenje relativne visine izazvanih kontrakcija izolovane mokraćne bešike pacova. One dovode do spastičnih mikcionih kontrakcija, tj. do smanjenja funkcionalnih svojstava mokraćne bešike pacova. Za razliku od antiholinesteraza, acetilholin izaziva povećanje spazma i ujedno povećanje mikcionih kontrakcija. Razlika između acetilholina i neostigmina, s jedne strane, i organofosfornih antiholinesteraza, s druge strane, može se ustanoviti s obzirom na visinu nastajanja spazma bez stimulacije nerva. Acetilholin i neostigmin dovode bez stimulacije nerva brzo do povećanja tonusa, a druge antiholinesteraze tek nakon stimulacije nerva.

Soman, medemo i metilfluorofosforilholin spada među najjače antiholinesteraze. Reaktivacija inhibisane *in vitro* holinesteraze je moguća u slučaju trovanja sa medemo¹¹, dok kod somana^{8,12} i metilfluorofosforilholina¹³ nije moguća. Reaktivacija nije moguća kod somana zbog procesa »starenja« kombinacije enzim-inhibitor i dealkilacije jednog radikala fosforilisanog enzima⁸. Mada reaktivacija kod somana i metilfluorofosforilholina nije moguća *in vitro*, TMB-4, kako se vidi iz ovih eksperimenata, deluje na preparaciju trovanu tim jedinjenjima spazmolitički, što je u skladu sa nalazom da TMB-4 pored reaktivatorskih ima i direktna, tj. atropinu slična delovanja¹⁴.

Kako se vidi iz ovih rezultata, benaktizin jače deluje od atropina i karamifena. Cohen¹⁵ je našao da benaktizin deluje jače od atropina centralno u odnosu na oxo-tremorin, a slabije periferno od atropina. Verovatno da su receptori u mokraćnoj bešici pacova slični onima u centralnom nervnom sistemu, pa je u ovom eksperimentu jače potencije benaktizin od atropina.

Efikasnost holinolitika i oksima kod raznih antiholinesteraza i acetilholina je zavisna od dva različita faktora. Prvo, od efektivne doze holinolitika i oksima i procesa »starenja« kombinacije enzim-inhibitor. Visoko efektivne koncentracije holinolitika i oksima deluju kod svih navedenih antiholinesteraza i acetilholina spazmolitički, iako se pouzdano zna da reaktivacija humanih eritrocita inhibisanih metilfluorofosforilholinom *in vitro* nije moguća¹³, dok se enzim inhibisan somanom vrlo teško

reaktivira¹². Berri i sar.¹² smatraju da se acetilholinesteraza inhibisana somanom teško reaktivira zato što su za ovo potrebne visoke koncentracije oksima koje se zbog njihove toksičnosti in vivo ne mogu postići. Kako su oksimi neefikasni u trovanju somanom, čak i kada se primene preventivno^{7, 17}, to se, pored brzog starenja kompleksa enzim-inhibitor¹⁶ i njegove neadekvatne koncentracije¹², uzrok ovoj pojavi pripisuje i steričkim smetnjama⁹.

Rezultati iz ovog rada su unekoliko različiti od rezultata istih autora¹⁴, objavljenih 1968. godine. Statistička metoda pB₅₀, tj. negativni logaritam molarne koncentracije holinolitika nije bio bitno različit pre ili posle antiholinesteraza. U ovom radu, međutim, pokazano je da se menja osetljivost prema holinolitikima nakon antiholinesteraza. Mislimo da je različit rezultat uslovljen različitom tehnikom ispitivanja. Pri ispitivanju pB₅₀ infundirani su holinolitici postepeno, dok su u ovom eksperimentu injicirani odjedanput u punoj dozi.

ZAKLJUCAK

Antiholinesteraze na mokraćnoj bešici izolovanoj sa nervom povećavaju spazam prvih 1—3 minuta, a zatim smanjuju izazvani efekat stimulacije nerva. Egzogeni acetilholin na izolovanoj mokraćnoj bešici sa nervom izaziva povećanje spazma i povećanje mikcionih kontrakcija.

Atropin, karamifen i benaktizin smanjuju efekat stimulacije nerava na kontrolnoj bešici. Najjače deluje benaktizin. Na bešici intoksiciranoj antiholinesterazama najjače deluju benaktizin i karamifen.

Reaktivacija inhibisane acetilholinesteraze somanom i metilfluorofosforilholinom nije moguća. TMB-4, reaktivator, međutim, na izolovanoj mokraćnoj bešici deluje spazmolitički.

KAMENKO BRANKOV, BOGDAN BOŠKOVIĆ UND CEID HUKOVIĆ

EINFLUSS DER CHOLINOLITIKA AUF DEN EFFEKT DER ANTICHOLINESTERASEN IN VITRO

ZUSAMMENFASSUNG

Anticholinesterasen, an der mit Nerv isolierten Harnblase, vergrößern den Spasmus in ersten 1—3 Minuten und vermindern dann den herangerufenen Effekt der Nervenstimulation.

Exogenes Azetylcholin führt, an der mit Nerven isolierten Harnblase, Vergrößerung des Spasmus herbei, sowie auch Vergrößerungen der Harnabsonderungskontraktionen.

Atropin, Caramiphen, Benaktizin vermindern den Nervenstimulationseffekt an der Harnblase die zur Kontrolle diente. An die Harnblase mit anticholinesterase intoksizierte, wirken am stärksten Benaktizin und Caramiphen.

Die Reaktivierung der inhibierten Azetylcholinesterase ist durch Soman und Methylfluorophosphorilcholin nicht möglich. TMB-4, ein Reaktivator, wirkt dagegen spasmolitisch auf die isolierte Harnblase.

LITERATURA

1. H. Kevitz, I. Wilson and D. Nachmansohn: Arch. Biochem., 64, 455 (1956).
2. I. Wilson and F. Sondheimer: Arch. Biochem. Biophys., 64, 456 (1956).
3. D. Davies and A. Green: Brit. J. Ind. Med., 16, 128 (1959).
4. J. Fleisher, H. Mishel, L. Yates, and C. Harrison: J. Pharmacol. Exp. Therap., 129, 31 (1960).
5. S. Huković, J. Rand and S. Vanov: Brit. J. Pharmacol. and Chemother., 24, 178 (1965).
6. S. Huković, i I. Bubić: Acta Medica Jugoslavica, 17, 300 (1963).
7. A. Loomis, and B. Salafsky: Toxic. appl. Pharmac., 5, 685 (1963).
8. H. Fleisher and L. Harris: Biochem. Pharmacol., 14, 641 (1965).
9. B. Bošković, M. Maksimović and D. Minić: Biochem. Pharmacol., 17, 1738 (1968).
15. S. Huković, i I. Bubić: Acta Medica Jugoslavica, 17, 279 (1963).
11. E. Tammelid: Svensk, kem, tidskr., 70, (4), 157 (1958).
12. W. Berry, D. Davies and J. Rutland: Biochem. Pharmacol., 15, 1259 (1966).
13. J. Enander: Acta chem. Scand. 12, 780 (1958).
14. F. Hobbiger and W. P. Sadler: Brit. J. Pharmacol. and Chemother., 14, 192 (1959).
15. M. Cohen: Arch. int. Pharmacodin., 169, 412 (1967).
16. K. Berry and D. Davies: Biochem. J., 100, 572 (1966).
17. E. Heilbronn and B. Talagen: Biochem. Pharmac. 14, 73 (1965).
18. S. Huković, K. Brankov and S. Miletic: Jugoslav. Physiol. Pharmac. acta, 4, 73 (1968).

