

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XLVIII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

KNJIGA 17.



Urednik
PAVEL ŠTERN,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO
1973.

KEMO VALJEVAC i PAVEL ŠTERN

POKUŠAJ SPECIFIČNE TERAPIJE BOTULINUS INTOKSIKACIJE I ODNOS PREMA ANTITOKSIČNIM SERAMA

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 10. I 1972. god.)

UVOD

Terapija intoksikacije Botulinus toksinom (BT) predstavlja još uvijek neriješen medicinski problem. Iako se o mehanizmu djelovanja BT dosta zna, ipak su terapijske mogućnosti zasad veoma skućene. U stvari, jedino sredstvo koje sigurno štiti od intoksikacije je antitoksični serum (AS). Međutim, tu treba upozoriti da AS može da zaštiti samo u veoma ranoj fazi intoksikacije kad još klinička slika nije potpuno razvijena. Kasnije, kako klinička slika postaje izrazitija, i njegovo djelovanje postaje sve manje uspješno. Zapravo AS može da djeluje samo na toksin koji još nije vezan na mjestu svog djelovanja na završecima motornih nerava, gdje izaziva neuromuskularni blok i ekstremnu mišićnu slabost (B u r g e n i ostali, 1948; W h a l e r, 1967; W r i g h t, 1955). Uz to treba znati da se BT, uprkos svojim velikim molekulama, relativno brzo veže i da su potrebne izvanredno male količine ovog otrova da bi katastrofalno djelovao. Prema H a b e r m a n n u (1967; 1969), smrtna doza za čovjeka iznosi oko 0,003 gama, što dovoljno ilustruje izvanredno veliku toksičnost ovog otrova. Toksin, kad je jedanput vezan na nervnim završecima, izaziva promjene koje veoma dugo perzistiraju iako se ne zna da li on tu trajno ostaje ili samo trajno inhibira neki proces ili enzim. Prema nekim autorima, potrebno je godinu dana da bi se muskulatura definitivno oporavila nakon trovanja (T h e s l e f f, 1961). Na sve ove promjene AS ne može djelovati i ne može poništiti djelovanje jedanput vezanog toksina.

Na osnovu gornjih činjenica moramo zaključiti da bi za uspješno liječenje botulizma bilo potrebno aplicirati AS u veoma ranoj fazi intoksikacije. Na žalost, to ćemo biti u mogućnosti samo u rijetkim slučajevima, jer se automatski nameće pitanje rane dijagnoze. Međutim, da bi se dijagnoza postavila, moraju postojati simptomi, a kad su simptomi razvijeni, tada je toksin već vezan i na njega se može samo djelomično uticati sa AS.

Iz svega ovoga proizlazi da AS ni izbliza ne može zadovoljiti terapijske potrebe u slučaju BT-intoksikacije. Neophodno bi bilo pronaći neko sredstvo koje bi, upotrijebljeno zajedno sa AS, dopunjavalo njegovo djelovanje neutralizirajući aktivnost već vezanog toksina, što bi dovelo do poboljšanja u neuromuskularnoj transmisiji i do bržeg opravljavanja zahvaćene muskulature. Samim tim takvo sredstvo bi moglo djelovati i u kasnijoj fazi intoksikacije kad AS više ne djeluje. Međutim, uprkos svima nastojanjima da se pronađe, takvog sredstva još uvijek nema. Izvjesni rezultati dobijeni su sa guanidinom (Cherington i Ryan, 1970), ali može se reći da je time problem samo načet, ali ne i definitivno riješen.

Mi smo u toku našeg desetgodišnjeg rada na problemu terapije BT-intoksikacije pronašli nekoliko farmaka koji signifikantno produžuju život miševa zatrovanih sa BT, ali, na žalost, nijedan od njih nije bio tako efikasan da bi miševi definitivno preživjeli. To su bili, između ostalih, u prvom redu flufenazin (FP) (Stern i Boras, 1968) kao najefikasniji, a zatim aminoguanidin (AG) (Boras i Stern, 1969) i tricianoaminopropen (TAP) (Stern i Boras, 1968). Zato smo smatrali potrebnim ispitati ove supstance u kombinaciji sa AS.

S druge strane, ako se podsjetimo da je osnovni mehanizam djelovanja BT blok u oslobađanju acetilholina (ACh) na okončinama nerava (Burgin i ostali, 1948) i da smo mi ranije dokazali da se taj blok može probiti nekim supstancama koje izazivaju grčeve ili tremor, katalepsiju ili nemir, ili pak druge motorne manifestacije (ali bez uticaja na dužinu života zatrovanih miševa) (Stern i Valjevac, 1971), smatrali smo potrebnim ispitati i neke od ovih supstanci u kombinaciji sa AS.

Cilj naših eksperimenata bio je da se vidi da li će se djelotvorni efekti navedenih supstanci sumirati sa djelovanjem AS tako da bi se postiglo izlječenje i onih teških slučajeva trovanja kad nijedna od navedenih komponenata ne djeluje. S druge strane, cilj nam je takođe bio da utvrdimo da li se u ranoj fazi intoksikacije može postići potpuna zaštita i sa veoma malim, nedjelotvornim dozama AS u kombinaciji sa djelotvornim supstancama, čime bi se mogla smanjiti doza AS. Smanjenje doze AS smanjilo bi i eventualne anafilaktičke reakcije.

Da bismo mogli prići našem radu, morali smo prvo izvršiti neka preliminarra istraživanja. Naime, morali smo ustanoviti:

- optimalnu dozu AS za miševe koja, injicirana neposredno nakon BT, štiti od intoksikacije sve životinje, tj. 100%;

- testiranje efekta te optimalne doze injicirajući je u raznim fazama intoksikacije sve dok ona ne bude više djelotvorna;

- najmanju (graničnu) dozu AS, injiciranog neposredno nakon BT, koja još ima minimalan efekat, odnosno koja zaštićuje 20—30% miševa.

Zatim smo na osnovu rezultata preliminarne istraživanja kombinovali spomenute farmake sa optimalnom i minimalnom dozom AS nakon određenog vremena iza intoksikacije i neposredno nakon intoksikacije.

METOD RADA

U eksperimentima smo upotrebljavali bijele miševe oba spola, tjelesne težine 20—25 grama. Tokom eksperimenta životinje kontrolne i poku-
sne grupe bile su pod istim temperaturnim i drugim uslovima, a vodu i

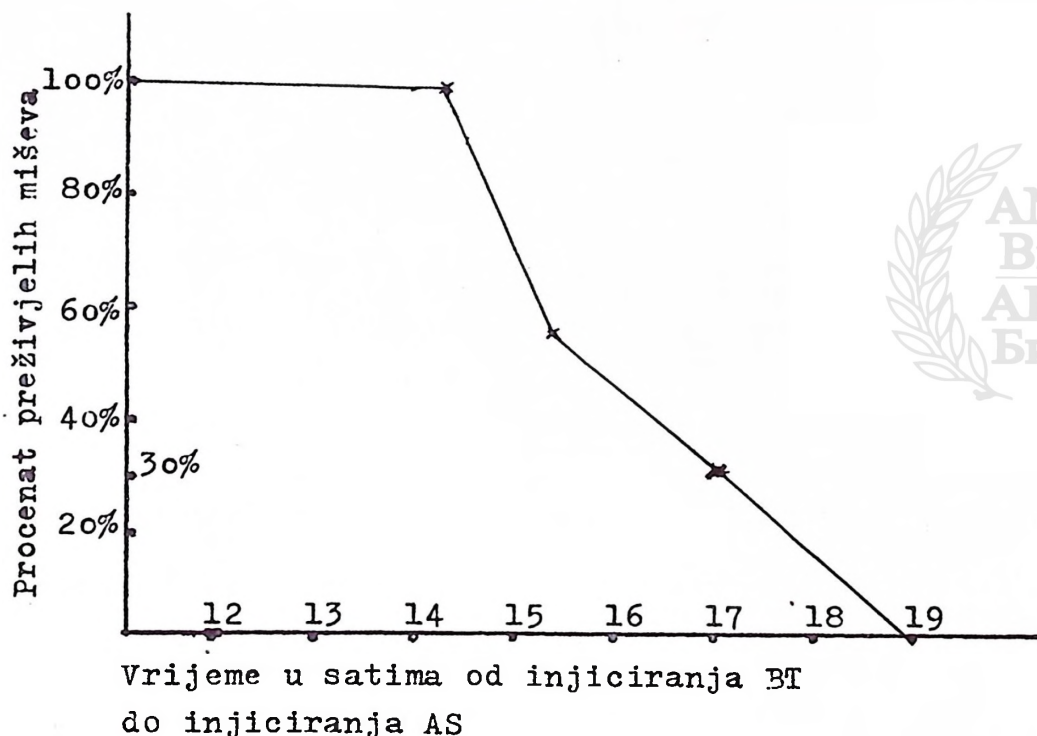
hranu su imale ad libitum. Supstance su otapane u destilovanoj vodi i aplicirane (ip., iv., im. ili sc. AS smo davali im. u različitim dozama i u različitim fazama intoksikacije, a BT smo uvijek davali sc. u dozi koja izaziva smrt miševa u roku od 48 ± 6 sati.

Kao što smo već u uvodu rekli, morali smo izvršiti neka preliminarna istraživanja da bismo dobili neke podatke neophodne za naše eksperimente. Injicirajući različite količine originalnog i razblaženog AS*) neposredno nakon intoksikacije i u kasnijim fazama intoksikacije sa BT*), dobili smo slijedeće podatke:

1. Optimalna, tj. najmanja količina originalnog AS koja, data neposredno nakon intoksikacije, štiti sve (100%) miševe iznosi 0,05 ml/miša.

2. Injicirajući tu optimalnu dozu AS intoksiciranim miševima u različitim fazama intoksikacije i prateći zaštitni efekat te doze, dobili smo rezultate koji su prikazani na krivulji:

KRIVULJA



Kao što se iz krivulje vidi, AS pruža sigurnu zaštitu ako se daje u vremenu do 14—15 sati iza intoksikacije sa BT. U kasnijoj fazi intoksikacije njegov efekat je sve slabiji, tako da već nakon 19 sati potpuno nestaje. Najpovoljnije vrijeme injiciranja te optimalne doze za naše eksperimente uzeli smo 17 sati, jer AS injiciran u tom vremenu štiti samo

*) Tvornici BEHRINGWERKE AG, Marburg a/L, zahvaljujemo za anti-toksični botulinus serum i botulinus toksin.

20—30% miševa. Na taj način smo u mogućnosti da vidimo da li će injiciranje AS u kombinaciji sa različitim supstancama dovesti do boljeg zaštitnog efekta nego što ga ima sam AS, odnosno da li će pri toj kombinaciji preživljavati veći procenat miševa.

3. Prilikom eksperimenata sa minimalnim dozama AS datog istovremeno sa BT utvrdili smo da AS u razblaženju 1:100 u količini od 0,1 ml/miša štiti oko 20—30% miševa i tu dozu smo uzeli kao najpogodniju za naše eksperimente. Cilj nam je bio, kao što smo gore rekli, da kombinovanjem te doze sa drugim djelotvornim supstancama postignemo da nam preživljava veći procenat miševa nego što je to slučaj pri davanju samog AS.

Pošto smo dobili gornje podatke iz preliminarnih istraživanja, mogli smo preći na naše glavne eksperimente. Njih bismo mogli podijeliti u dvije grupe: 1. kombinovanje različitih farmaka sa optimalnom dozom AS 17 sati nakon intoksikacije sa BT; 2. kombinovanje istih farmaka sa minimalnom dozom AS, tj. 0,1 ml/miša, razrjeđenja 1:100, ali ovog puta neposredno nakon intoksikacije sa BT. Metoda rada bila je slijedeća:

1. Uzimali smo po četiri grupe miševa. Jedna grupa je dobila samo BT i služila je kao kontrola. Druga grupa je dobila 17 sati iza intoksikacije sa BT 0,05 ml/miša AS originalne otopine im., treća grupa je dobila nakon istog vremena iza intoksikacije kombinaciju AS+supstanca i četvrta je dobila nakon istog vremena iza BT samo supstancu. Na taj način smo mogli jasno razlučiti uolikoj mjeri zaštitni efekat potiče od djelovanja svake komponente posebno, a koliko od efekta sumiranja djelovanja obje komponente.

2. Prilikom ovih eksperimenata uzimane su takođe po četiri grupe miševa. Raspored grupa i način injiciranja supstanci bio je isti, samo što smo ovog puta davali AS razrijeđen 1:100 u količini 0,1 ml/miša, i to neposredno nakon intoksikacije sa BT.

REZULTATI

U pokusu su bile slijedeće supstance (u kombinaciji sa AS):

1. Supstance za koje smo ranije utvrdili da imaju efekta kod BT-intoksikacije: FP, AG i TAP.

2. Neke od supstanci za koje smo ranije dokazali da su u stanju da probiju blok u lučenju ACh na okončinama nerava: oksotremorin, guanetidin, DEC, strihnin, amfetamin, kofein, ethamivan (vandid) i pentazol.

U tabeli 1 prikazani su rezultati eksperimenata prilikom injiciranja navedenih supstanci sa optimalnom dozom AS 17 sati iza intoksikacije sa BT. U tabeli je naveden procenat preživljavanja miševa, i to tako da grupu I predstavljaju životinje koje su dobile samo AS 17 sati iza BT, grupu II životinje koje su dobile kombinaciju AS+supstanca 17 sati iza BT i grupu III životinje koje su dobile samo supstancu takođe 17 sati iza BT. Kontrola, tj. životinje koje su dobile samo BT, nije unesena u tabelu, jer su miševi iz ove grupe svi uginuli u određenom roku, tj. za 48 ± 6 sati. U tabelu su unesene doze i način aplikacije samo supstanci koje su bile u pokusu, dok je doza AS bila uvijek ista, tj. 0,05 ml/miša im. originalne otopine.

Tabela 1.

Supstanca	Doza i način aplikacije	Procenat preživljavanja miševa		
		I gr.	II gr.	III gr.
Flufenazin	10 mg/kg ip.	30%	10%	0%
Flufenazin	10 mg/kg ip.	20%	0%	0%
Flufenazin +	10 mg/kg ip.	20%	10%	0%
IS—17 57	1 mg/kg ip.			
Aminoguanidin	100 mg/kg ip.	30%	10%	0%
TAP	10 mg/kg ip.	30%	10%	0%
TAP	10 mg/kg ip.	30%	40%	0%
TAP	10 mg/kg ip.	20%	30%	0%
TAP	10 mg/kg ip.	30%	10%	0%
Oksotremorin	0,25 mg/kg iv.	30%	10%	0%
DEC	50 mg/kg ip.	30%	10%	0%
Guanetidin	25 mg/kg ip.	20%	10%	0%
Strihnin	1 mg/kg ip.	20%	0%	0%
Amfetamin	50 mg/kg ip.	20%	10%	0%
Kofein	50 mg/kg ip.	30%	10%	0%
Ethamivan	50 mg/kg ip.	20%	10%	0%
Pentazol	60 mg/kg ip.	20%	0%	0%

Kao što se iz tabele 1 vidi, nijedna od supstanci koje su bile u pokusu nije povećala procenat preživljavanja miševa zatrovanih sa BT. Čak je u većini slučajeva taj procenat bio niži u kombinaciji AS+supstanca nego što je to kod AS samog. Čak i FP, koji se u svim našim dosadašnjim pokusima pokazao kao najbolji i u kojeg smo polagali najviše nade, nije ni malo poboljšao situaciju u ovim eksperimentima, već je, štaviše, pogoršao procenat preživljavanja. Jedino kod TAP-a dobili smo veoma šarolike rezultate: jedanput je djelovao poboljšavajući, a drugi put, prilikom ponovljenih eksperimenata, pogoršavajući procenat preživljavanja. Ali, i kada je djelovao pozitivno, ti rezultati nisu bili tako ubjedljivi da bi se iz njih mogli izvlačiti zaključci koji daju neke nade.

U tabeli 2 prikazani su rezultati iste kombinacije (AS+supstanca), samo što je ovog puta uzimana nedjelotvorna doza AS, tj. razblaženje 1:100, od čega je miševima davano po 0,1 ml im., i to neposredno nakon intoksikacije sa BT. Dakle, razlika je samo u dozi i vremenu davanja AS i supstanci.

Tabela 2.

Supstanca	Doza i način aplikacije	Procenat preživljavanja miševa		
		I gr.	II gr.	III gr.
Flufenazin	10 mg/kg ip.	30%	10%	0%
Aminoguanidin	100 mg/kg ip.	20%	10%	0%
TAP	10 mg/kg ip.	30%	40%	0%
Oksotremorin	0,25 mg/kg iv.	20%	10%	0%
Guanetidin	50 mg/kg ip.	30%	20%	0%
DEC	50 mg/kg ip.	30%	10%	0%
Strihnin	1 mg/kg ip.	20%	0%	0%
Amfetamin	50 mg/kg ip.	30%	0%	0%
Kofein	50 mg/kg ip.	20%	0%	0%
Ethamivan	50 mg/kg ip.	20%	20%	0%
Pentazol	60 mg/kg ip.	30%	20%	0%

I ovdje vidimo da nijedna od supstanci koje su bile u pokusu nije potencirala djelovanje AS. Kao i u prethodnim pokusima, vidimo da je većina supstanci čak oslabila djelovanje seruma, izuzev TAP-a, koji je pokazao neznatno sinergističko djelovanje.

DISKUSIJA

Naša pretpostavka da će kombinacija AS sa supstancama za koje smo ranije dokazali da su signifikantno produžuju život miševa zatrovanih sa BT djelovati bolje i od samog seruma i od navedenih supstanci — nije se ispunila. Isto tako supstance za koje smo ranije dokazali da su u stanju da probiju blok u oslobađanju ACh na okončinama nerava nisu potencirale djelovanje antitoksina. Međutim, moramo konstatirati da je teoretskih opravdanja da se izvrše ova ispitivanja bilo.

Logično je bilo pretpostaviti da će FP, čije djelovanje preko ekstrapiramidalnog sistema rezultira rigorom i pojačanim oslobađanjem ACh na okončinama nerava i u CNS-u (Potkonjak, 1971), i AS inaktivirajući toksin koji još nije definitivno vezan djelovati sinergistički, iako na različitim nivoima. Naime, antitoksin djeluje na toksin koji još nije definitivno vezan i time smanjuje njegovu količinu na nervnim završecima (gdje je zahvatna tačka BT) (Burgeni ostali, 1948), pa bi FP, koji se pokazao efikasnim i kod daleko većih doza toksina, trebalo da lakše razvija svoje djelovanje i ukloni taj dio patološkog mehanizma. Isto se to odnosi na TAP, za koji smo dokazali da ima efekta na BT-intoksikaciju (Stern i Boras, 1968) potpomažući regeneraciju nervnog tkiva (Egyhazi et Hyden, 1961), kao i na AG, koji inhibirajući diaminooksidazu (Zeller, 1956) izaziva nagomilavanje histamina u tkivima, što rezultira povećanom osjetljivošću tkiva na ACh (Stern, 1968).

Očekivali smo, takođe, da će supstance koje izazivaju grčeve ili tremor lakše i trajnije uklanjati blok u oslobađanju ACh na završecima nerava, jer bi taj blok, u ovom slučaju, bio slabiji pod uticajem AS, koji inaktivira jedan dio toksina, tako da se ovoga manje veže na nervnim završecima. Međutim, kao što smo na početku rekli, te pretpostavke se nisu ispunile, štaviše, dobili smo lošije rezultate nego kad smo davali sam AS.

Dobijeni rezultati su prilično iznenađujući i mi ih zasada ne bismo mogli objasniti. Mi smo posmatrali uticaj spomenute kombinacije isključivo na preživljavanje miševa, a kakvi su se patofiziološki procesi odvijali u organizmu tih miševa, kakve su se promjene odigravale u funkciji nervnog sistema, a posebno na nivou neuromuskularne transmisije, mi ne možemo da objasnimo. Treba uzeti u obzir i pretpostavku da različiti specijesi različito reaguju na BT (Tyler, 1963) i da to sugerira važnost ispitivanja BT-intoksikacije na čovjeku. U svakom slučaju, mi ipak smatramo da bi, dok se ne pronađe neko bolje sredstvo, FP trebalo upotrijebiti u slučaju eventualnog trovanja ljudi sa BT.

Iz ovih pokusa može se zaključiti da se jednom vezani toksin ne može više odvojiti od mjesta vezivanja iako dođe do oslobađanja ACh na otrovanim završecima nerava i da taj proces napreduje do uginuća. Normalni impulsi iz α -ćelija nemaju više efekta. Prema tome, detoksikacija BT-trovanja sa AS nije nikakva specifična terapija. Tek trajno oslobađanje ACh

sa otrovanih nerava, kako smo to nedavno pokazali sa otrovom pauka *Latrodectus tredecimguttatus*-a (Stern i Valjevac), ima izgleda na uspjeh. Ovi pokusi istovremeno pokazuju kojim putem treba ubuduće ići da bi se došlo do efikasnog lijeka od BT-trovanja.

KEMO VALJEVAC and PAVEL STERN

THE ATTEMPT OF SPECIFIC THERAPY OF BOTULINUS INTOXICATION AND ITS RELATION TO THE ANTITOXIC SERUM

SUMMARY

Mice intoxicated with botulinus were administered combination of antitoxic serum and various substances, and the effect were observed. Substances that had already been proved to increase significantly the lifespan of intoxicated mice have been put to test, as well as some other substances which are known to be capable of re-starting acetylcholine release that was blocked by botulinum toxine.

The combination of serum with these substances was administered at the beginning and in the later stage of intoxication.

It was shown that above mentioned substances, when combined, did not increase the percentage of survival more than each substance alone.

The discussion stressed the point that detoxication of botulism with antitoxic serum is not specific therapy because its effect is limited to the early stage of intoxication.

New ways of searching for efficient therapy of botulism were indicated in the discussion.

LITERATURA

- Burgen A. S., Dictens F., Zatman L. J.: The Action of Botulinum Toxin on the Neuromuscular Junction. *J. Physiol.*, 109, 10 (1948).
- Boras J., Stern P.: Učinak povećane količine histamina u tkivu miša na akutnu toksičnost Botulinus toksina. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 20, 161 (1969).
- Cherington M. and Ryan D. W.: Treatment of botulism with Guanidine. *New England Journal of Medicine*, 282, 195 (1970).
- Egyhazi E. et Hyden H.: Aspects nouveaux du fonctionnement cérébral. *Med. et Hyg. (Genève)*, 736 (1961).
- Habermann E.: Aktuelle Fragen über Botulinum-Toxine. *Katastrophenmedizin*, 33 (1967).
- Habermann E.: Über hochgiftige Stoffe bakterieller und tierischer Herkunft. *Katastrophenmedizin*, 35 (1969).
- Potkonjak D.: Uticaj substanci koje izazivaju rigiditet na nivo ukupnog acetilholina iz mozga štakora. *Disertacija*, Sarajevo, 1971.
- Stern P.: Beitrag zur Wirkungsweise des Histamins im Zentralnervensystem. *Wien. klin. Wschr.*, 80, 181 (1968).
- Stern P., Boras J.: Chemotherapy in Botulinus poisoning. *Europ. Soc. for the Study of Drug Toxicity*, 9, 189 (1967).
- Stern P., Boras J.: The effect of Tricyanoaminopropene upon mice poisoned with Botulinum Toxin, 5, 187 (1968).
- Stern P., Valjevac K.: Mechanism of Action of Botulinum Toxin. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 190, 47 (1971).

- Stern P., Valjevac K.: Beitrag zur Therapie der Botulinus Intoxikation. (In press).
- Thesleff. S.: Nervous Control of Chemosensitivity in Muscle. Annals of The New York Academy of Sciences, 94, 535 (1961).
- Tyler H. R.: Botulinus Toxin: Effect on the Central Nervous System of Man. Science, 139, 847 (1963).
- Zeller E.: The fate of Histamine in the body, with particular reference to the Enzymology of Histamine oxidation. CIBA Foundation Symposium on Histamine. J. Co. A. Churchill LTd, London, 339 (1956).
- Whaler B. C.: »Neurotoxins« in W. Root, F. Hoffmann: Physiological Pharmacology, Vol. IV, 399, Academic Press, (1967).
- Wright G. P.: The neurotoxins of Clostridium botulinum and Clostridium tetani. Pharmacol. Rev., 7, 413 (1955).

