

Vývoj nových metod a prostředků pro diagnostiku a profylaxi otrav bojovými organofosfáty

Nervově paralytické látky (NPL), nazývané také bojové organofosfáty, patří stále k nejdůležitějším vysoce jedovatým sloučeninám použitelným jako náplně chemických zbraní (CHZ). Hledání optimálních způsobů ochrany (diagnóza, první pomoc, antidotní terapie a profylaxe) tedy zůstává v centru zájmu jak vojenských toxikologických laboratoří všech moderních armád, tak výzkumných center v civilním sektoru. Je tomu tak proto, že hrozba použití CHZ přes podepsání Úmluvy o jejich zákazu a likvidaci v r. 1993 v Paříži, která vešla v platnost 29. 4. 1997, nezmizela a je stále aktuální. Je to mj. i proto, že existuje reálná možnost, že některé státy se členy Úmluvy nestanou, a již bohužel v praxi možnost teroristy využítá - útok sarinem v japonských městech Matsumoto a Tokio.

* * *

Přestože Úmluva bude z hlediska látek ve spektru jejího zájmu aktualizována a doplňována, nahodilé objevy i cílená syntéza (event. výroba) bude riziko použití nových vysoce toxických látek zvyšovat. Navíc - i když budou nejtoxičtější látky sledovány Úmluvou - jejich méně toxické analogy jsou / budou využívány pro civilní účely (typickým příkladem mohou být organofosfáty, OF). NPL jako je sarin, VX, soman atd. budou Úmluvou pokryty, avšak celá řada organofosforových insekticid (OFI) se bude i nadále používat v zemědělství, průmyslu atd.

Princip účinku i zásady terapie jsou u intoxikací oběma typy látek v podstatě stejné. Z tohoto důvodu jsou tedy předkládané výsledky použitelné i mimo armádu. -

Pro snazší pochopení toxodynamických souvislostí při otravě NPL bylo popsáno schematické znázornění těchto dějů. V organismu probíhají čtyři hlavní fáze účinku NPL: resorpce, transport, metabolizace a vlastní toxický efekt. Při tomto ději nastávají ztráty, které jen potvrzují vysokou toxicitu NPL.

Vlastní toxický efekt je totiž realizován jen zlomkem podané dávky NPL, zbytek podané dávky představuje ztráty, vznikající nejrozličnějším způsobem. Ztráty mohou dosáhnout podle druhu NPL 50-99 %. Při expozici je kromě i.v. podání pozorováno zpoždění, které je dáno průnikem látky biologickými bariérami. Ztráty v této fázi jsou spíše fyzikálně chemického charakteru, průnik NPL do oběhu je tímto dějem zpomalen.

V transportním systému - krevním oběhu - reaguje NPL s cholinesterázami a dalšími hydrolázami v krvi, některé NPL se váží na bílkoviny plazmy, a některé mohou být již v krvi částečně detoxikovány. Transportním systémem je NPL zanesena na místo metabolizace a toxického efektu.

Metabolizace zahrnuje detoxikační reakce zejména v játrech, exkreci a interakci s enzymy. V místě toxického efektu (centrální a periferní nervový systém a některé efekторы) NPL inhibuje acetylcholinesterázu (AChE, EC 3.1.1.7), která již nemůže štěpit neuromediátor acetylcholin, a projeví se důsledky jeho zvýšené koncentrace. Mezi nejdůležitější reprezentanty NPL se řadí sarin, soman a VX látka.

Z hlediska účinku v AČR zavedených antidot je možné konstatovat, že tato jsou dostatečně účinná u intoxikací sarinem a VX látkou, avšak málo efektivní u otrav somanem.

Z hlediska farmakologického působení a možností terapie ze spektra NPL představuje soman velmi vážné nebezpečí z několika hledisek: toxicitou je srovnatelný s oběma výše uvedenými látkami, avšak z hlediska terapeutické účinnosti zavedených i perspektivních antidot je intoxikace somanem nejhůře léčitelná. Z tohoto hlediska je právě výzkumu mechanismu účinku somanu věnována daleko větší pozornost než účinkům ostatních NPL.

Soman se poměrně rychle vstřebává všemi branami vstupu, inhibuje cholinesterázy v periferním i centrálním nervovém systému (především AChE) a vzhledem k jeho vysoké lipofilítě má vysokou afinitu k enzymům mozkovým.

Jako příčina obtížné terapeutické zvládnutelnosti je označován děj, zvaný dříve „stárnutí“, později z hlediska molekulárních mechanismů upřesněný jako dealkylace. Vzhledem k tomu, že AChE se vyskytuje i v erytrocytech, dealkylace probíhá i zde. Jedná se o změnu formy inhibované AChE ze stavu, který je možno ovlivnit tzv. reaktivátory, a tím znovu obnovit normální aktivitu AChE (reaktivovatelná forma) na stav, kdy reaktivátory nepůsobí (nereaktivovatelná - dealkylovaná forma), a tedy i jejich podání intoxikovaným jedincům je neúčinné.

Soman je detoxikován v játrech, plazmě, podle některých autorů i v plicích, a tato část je z dalšího toxického efektu vyloučena. Ztráty somanu jsou způsobeny i vazbou na nespecifické esterázy a i tento podíl je pro vlastní toxický efekt ztracen. Z celkově podané dávky somanu se tak na vlastním toxickém efektu - inhibičním působení na AChE v mozku - podílí zhruba 1-3 % z podané látky.

Z hlediska terapeutického ovlivnění otrav somanem a vzhledem k charakteru inhibice AChE somanem je jasné, že současné reaktivátory nemohou být dostatečně účinné. Je proto nezbytné hledat nové, účinnější reaktivátory AChE, které by alespoň částečně eliminovaly rychlou dealkylaci komplexu enzym-inhibitor.

V posledních letech byla pozornost soustředěna na testování terapeutického účinku biskvartérního oximu HI-6. Avšak ani efekt HI-6 v kombinaci s cholinolytikem nedosahuje vůči somanu účinku jako antidotní terapie vůči jiným, snáze léčitelným NPL (sarin, VX látka).

Základním mechanismem účinku somanu je tedy stejně jako u jiných OF sloučenin zásah do cholinergního přenosu nervového vzruchu cestou ireverzibilní inhibice AChE. Monitorování vývoje změn aktivity cholinesteráz je prozatím nejlepším odrazem vývoje a závažnosti akutní intoxikace OF sloučeninami i NPL stejně jako odrazem účinku zvolené antidotní terapie těchto intoxikací.

V diagnostice otrav OF a NPL sloučeninami v humánní medicíně je sledována aktivita cholinesteráz v krvi, obsahující z 90 % erytrocytární AChE a z 10 % plazmatickou butyrylcholinesterázu (BuChE, EC 3.1.1.8). U laboratorního potkana je tento

poměr 79 % AChE a 21 % BuChE. Změny aktivity cholinesteráz v krvi více méně také odrážejí změny aktivity AChE v oblasti periferních a částečně i centrálních cholinergních synapsí.

Pro podporu tohoto tvrzení svědčí i studie japonských autorů, kteří prokazovali velmi úzký vztah mezi tíží symptomů a aktivitou krevní AChE u lidí, intoxikovaných sarinem. Tato korelace byla vyšší pro erytrocytární AChE a nižší pro plazmovou BuChE. Diagnostické hledisko tedy hraje roli při rozhodování o způsobu terapie a je velmi důležité pro posuzování, zda k expozici došlo či nikoliv.

Z tohoto pohledu je z NPL skutečně nejnebezpečnější soman, protože intoxikace jím způsobená je v současné době zavedenými antidoty obtížně léčitelná. Diagnostika zasažení somanem, NPL i ostatními OFI je pak založena na stanovení aktivity cholinesteráz v krvi a je jen orientační, indikující obecně expozici inhibitorů cholinesteráz.

Pokud by se podařilo vypracovat biochemický test, který by prokázal, v jakém stadiu se AChE inhibovaná somanem a dalšími NPL nachází (nedealkylovaná - dealkylovaná = reaktivovatelná - nereaktivovatelná), přispělo by to značnou měrou ke zlepšení diagnostiky i k upřesnění léčby.

Profylaktická opatření mají význam ve speciálních situacích, kdy je možné očekávat zvýšené riziko expozice NPL/OFI. K tomuto účelu se využívá profylaktického podání reverzibilních inhibitorů cholinesteráz, např. fysostigmin, syntostigmin, pyridostigmin nebo akridinové sloučeniny.

V řadě armád západních zemí je zaveden pyridostigmin, jehož použití limituje relativně vysoká toxicita, a tím je omezena velikost jeho dávky. Reverzibilní inhibitory tvoří s AChE komplex resistantní vůči NPL, ze kterého se uvolňuje aktivní enzym (AChE) samovolně. Při zasažení NPL působí tyto jen na volný enzym. Po relativně krátké době je NPL inaktivována a komplex AChE s reverzibilním enzymem slouží jako zdroj volného enzymu.

Druhým typem pro profylaxi jsou farmaka, která zvyšují toleranci organismu vůči nahromaděnému acetylcholinu, tj. parasimpatolytika. V poslední době je to typ profylaxe prozatím zkoušený jen experimentálně a využívající podání exogenní AChE, většinou fetálního původu. Z reverzibilních inhibitorů se nejvíce používá pyridostigmin, který je zaveden v různých armádách (např. USA, Kanada, Švýcarsko, Holandsko atd.). Užívá se 3x denně po 30 mg. Jeho dávku - a tím i profylaktickou účinnost - nelze zvýšit, neboť by došlo k předávkování, a tedy i k příznakům intoxikace. Pokud by se podařilo dávku pyridostigminu zvýšit a eliminovat jeho toxický efekt, bylo by možné zvýšit i jeho profylaktickou účinnost. To by bylo teoreticky možné, pokud by se pyridostigmin podával v kombinaci s jinými léčivy.

Cílem projektu tedy byly dva hlavní cíle:

1. Pomocí experimentálně získaných dat na zvířeti ověřit, zda existuje možnost zjistit reaktivovatelnost AChE po podání somanu a dalších NPL a zda tyto změny odpovídají účinnosti terapie zavedenými či vyvíjenými antidoty.
2. Srovnat profylaktickou účinnost pyridostigminu samotného a pyridostigminu v kombinaci s parasimpatolytiky proti intoxikaci supraletálními dávkami somanu.

Výsledky řešení

■ Biochemická metoda ke stanovení reaktivovatelnosti

V experimentech *in vitro* byla použita lidská krev od zdravého dobrovolníka (stáří 55 let). Krev byla exponována *in vitro* sarinem, somanem a látkou VX. Poté byla stanovena v těchto vzorcích aktivita AChE. Druhé stanovení aktivity AChE proběhlo za přítomnosti trimedoximu (reaktivátoru cholinesterázy) v určité výsledné koncentraci (reaktivační test), která zde není uvedena, protože je součástí know-how.

Existuje totiž jen velmi úzká hranice mezi koncentrací trimedoximu, která ještě nereaktivuje a vyšší koncentrací, která sice reaktivuje ale současně substrát štěpí také. Podle výsledků reaktivačního testu bylo vypočteno % reaktivace inhibované AChE.

Princip stanovení je následující: ke vzorku krve se přidá substrát (acetylthiocholin), který je AChE v krvi štěpen za vzniku thiocholinu a acetátu. SH-skupina thiocholinu reaguje s Ellmanovým reagens (5,5 -dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) za vzniku 5-merkaptu-2-nitrobenzoátu, který je fotometricky stanovován při 412 nm. Reakci je možno registrovat kontinuálně (pokud je takový spektrofotometr k dispozici) nebo diskontinuálně (reakce se po určité době (minuty) zastaví přidáním fysostigminu. V našich pokusech bylo použito kontinuálního spektrofotometrického měření (spektrofotometr Beckmann).

Druhé stanovení (reaktivační test) se provádí stejně, ale v přítomnosti reaktivátoru trimedoximu.

Experimenty *in vivo* probíhaly na psech kmene Beagle (samci ve skupinách po čtyřech zvířatech) a na laboratorních potkanech (Wistar, samci ve skupinách po šesti zvířatech). Zvířata byla intoxikována dávkou 2xLD₅₀ i.m. somanem, sarinem a VX látkou. V různých časových intervalech byla sledována aktivita AChE a proveden reaktivační test.

Pro somanem inhibovanou AChE *in vitro* byla demonstrována velmi nízká reaktivace (0-10 %), která se velmi rychle ještě snižovala v čase. Reaktivace 45-63 % byla pozorována pro inhibici AChE sarinem a pro AChE inhibovanou VX látkou byla reaktivace 80 % a vyšší.

V pokusech *in vivo* byl pozorován velmi rychlý pokles aktivity, dosahující rovnovážného stavu u potkanů asi za 6-8 min., u psů za 10 min. po podání somanu. Reaktivace se v průběhu intoxikace snižovala a cca za 50-60 min. nebyla krevní AChE reaktivovatelná ani u potkanů, ani u psů.

Při intoxikaci sarinem byl pozorován podobný pokles aktivity AChE jako u somanu u obou druhů použitých zvířat, ale reaktivace ještě po 100 min. dosahovala asi 60 %.

U otravy VX látkou byla inhibice AChE ve srovnání se dvěma předchozími látkami prodloužena - rovnovážný stav byl dosažen 20 min. po otravě (potkani), resp. 30 min. po podání somanu (psi). Reaktivace u obou druhů zvířat byla 120 min. po intoxikaci prakticky úplná - pohybovala se kolem 100 %.

Je jasné, že výsledky *in vitro* a *in vivo* si velmi dobře odpovídají. Popsaný test dovoluje i diferenciální diagnózu mezi použitými NPL: pokud je reaktivace nízká (0-10 %), jednalo by se o intoxikaci somanem, pokud by byla kolem 50-60 %, velmi pravděpodobně by se jednalo o intoxikaci sarinem a % reaktivace v rozmezí 80 % a více by svědčilo pro intoxikaci látkou VX.

Současně test umožňuje i rozhodnutí o účelnosti opakovaného podání reaktivátoru: pokud je reaktivace vyšší než 10 %, má terapeutický význam podání reaktivátoru opakovat. Pokud ne, opakované podání reaktivátoru bude neúčinné či dokonce kontraindikováno.

Z výsledků je možné odhadnout i poločas dealkylace (tj. doba za kterou se polovina AChE změní z reaktivovatelné na nereaktivovatelnou formu). Pro soman je to 5-10 min., pro sarin více než 2 hod. (odhad 10 hod.) a pro látku VX je to více než 24 hod.

Pro reaktivační test byla vlastními silami vyrobena souprava, obsahující nezbytné chemikálie (acetylthiocholin jako substrát, TRIS pufr pH 7,6, Ellmanovo reagens jako detekční činidlo pro SH- skupinu thiocholinu, který vzniká hydrolyzou substrátu a trimedoxim k provedení reaktivačního testu), dále náležitosti k odběru krve a k měření (zkumavky, pipety, melanžer, jehly, desinfekční roztok atd.). Soupravu je možno použít při požadavku na malý počet vyšetření krevní AChE (1-5), její kapacita však dovoluje stanovení 50 vzorků včetně reaktivace.

■ *Profylaxe proti otrávám NPL*

Profylaktická účinnost byla testována na myších a laboratorních potkanech konvenčního chovu (samci i samice) ve skupinách nejméně po šesti zvířatech. Nebyly pozorovány rozdíly v toxicitě sledovaných NPL v závislosti na pohlaví. Jako profylaktická antidota byla sledována pyridostigmin samotný a pyridostigmin v kombinaci s různými parasympatolytiky.

Nejlepší kombinace (tj. nejvyšší profylaktická účinnost proti otrávám sarinem, somanem a VX látkou) se jeví složením pyridostigmin, benactyzin a trihexyfenidyl. Tato kombinace chránila - podle druhu použité NPL - proti dávkám 1,5x až 16xLD₅₀. Proto byla navržena i pro humánní použití. Navíc bylo demonstrováno, že u zvířat, kterým byl podán PANPAL, následně byla intoxikována somanem a léčena kombinací benactyzinu a HI-6, se účinek této antidotní terapie asi dvojnásobně zvýšil, tj. že následná léčba intoxikace se u zvířat premedikovaných PANPAlem zlepšuje.

Dávky pro člověka byly stanoveny pomocí několika metod extrapolace experimentálních dat ze zvířete na člověka. Tyto dávky pro člověka zde nejsou uvedeny, protože se opět jedná o know-how, je možno jen konstatovat že dávka pyridostigminu je vyšší než je obvyklé. Profylaktické antidotum nazvané PANPAL je složeno ze dvou tablet:

Tableta A s řízeným uvolňováním obsahuje benactyzin a trihexyfenidyl,

Tableta B obsahuje pyridostigmin.

Toto antidotum bylo testováno na zdravých dobrovolnících. Během 24 hodin byl u dobrovolníků sledován vliv PANPALu na fyziologické, mentální a motorické funkce (tj. krevní tlak, tepová frekvence, elektrokardiogram, tělesná teplota, psychomotorická aktivita, vegetativní funkce, oční vyšetření). Dále byla stanovována hladiny dvou uvedených parasympatolytik v plazmě a aktivita AChE po podání pyridostigminu v krvi.

Studie se zúčastnilo 14 dobrovolníků, z nichž jeden v průběhu studie odstoupil, takže celkový počet byl 13. V použitých testech nebyly pozorovány žádné změny při očním vyšetření (akomodace), žádné změny v hodnotách krevního tlaku, teplotě, reakční rychlosti a dalších motorických funkcí. Byly pozorovány určité nevýznamné změny

srdeční činnosti bez vlivu na výkonnost a a subjektivní stav dobrovolníků. Nebyly pozorovány vedlejší účinky, které by bránily podání PANPALu lidem.

Hladiny použitých léčiv i mírné snížení aktivity krevní AChE svědčí pro to, že účinek PANPALu (tudiž i efektivní profylaxe) bude trvat až 8 hodin. Výsledky tedy jednoznačně prokázaly, že PANPAL je možné bez rizika použít, a tedy i zavést do výzbroje AČR (počítá se i se zavedením v Armádě SR).

Použitá dávka pyridostigminu v PANPALu je vyšší než dávka používaná pro pyridostigmin samotný zavedený v různých armádách (30 mg), a tedy i profylaktická účinnost a trvání profylaxe PANPAL jasně favorizuje.

Realizační výstupy:

- výsledky byly využity při jednání se zahraničními návštěvami (Holandsko, Anglie, USA, SRN aj.),
- na základě výsledků byly získány granty NATO pro spolupráci s Holandskem a SRN, v jednání je grant s USA,
- výsledky byly publikovány v našich (10) i zahraničních (12) časopisech a prezentovány na odborných akcích u nás (8) i v zahraničí (12) a na odborných skupinách NATO (3),
- výsledky byly využívány při pre- i postgraduální výuce, a to i na mezinárodní úrovni (kurzy NATO v ČR, výuka mezinárodních inspektorů OPCW Haag),
- na základě výsledků bylo do AČR zavedeno profylaktické antidotum PANPAL,
- reaktivační test byl doporučen zapracovat do spektra metodik pro vojenské nemocnice,
- reaktivační test a PANPAL byly doporučeny k využití pro potřeby OPCW v Haagu pro mezinárodní inspektory, kteří budou provádět kontrolu ničení CHZ.

Vzhledem k velkému počtu literárních citací nejsou tyto uvedeny a jsou dostupné buď u autora nebo v závěrečné zprávě.

Po většinu uplynulého desetiletí byla literatura v oboru vojensství a bezpečnosti zaplňována diskuzemi o takzvané „revoluci ve vojenských záležitostech“. Tento pojem bezprostředně navozuje představu vedení boje s nasazením špičkové techniky, včetně vysoce citlivých senzorů, komunikačních a výpočetních systémů, technologie stealth a zbraní s přesným naváděním. To, co se však z těchto diskuzí často vytrácí, je skutečnost, že k žádné revoluci nedojde do té doby, dokud technické zázraky nebudou spojeny s výraznými změnami v oblasti doktríny a organizace.

Elinor Sloanová

*(Správa pro strategické analýzy, velitelství národní obrany, Kanada)
„Zvyšování mobility“, NATO Revue, jaro 2001.*