Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

# RADOVI XXXVII, knj. 14.

**Stern, Pavao**

**1969**

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/848a1209-c780-416e-9221-a562a7588361

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

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

ANU BiH АНУ БиХ

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.)

## *UVOD*

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 modificirati sa reaktivatorima i holinoliticima.[1, 4, 7] Prema Fleisher-u i Haris-u,[8] uzrok neefikasnosti se tumači »starenjem« kombinacije enzim-inhibitor i dealkilacijom 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 glatkomišićni 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. metilfluorofosforlholin, 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° C ± 0,5° 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. Upotrebljene su sledeće supstance: soman (pinakol-metilfosfonofluorodat), 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-aldoksi) 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*

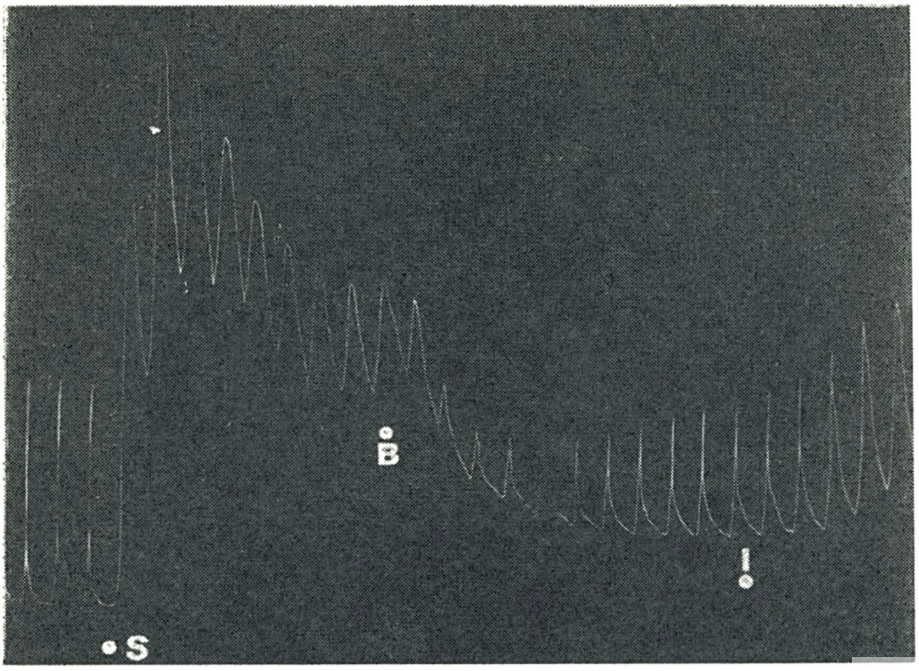
#### a) Uticaj antiholinesteraza i acetilholina

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 promenc 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*

ANU BiH АНУ БиХ

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.

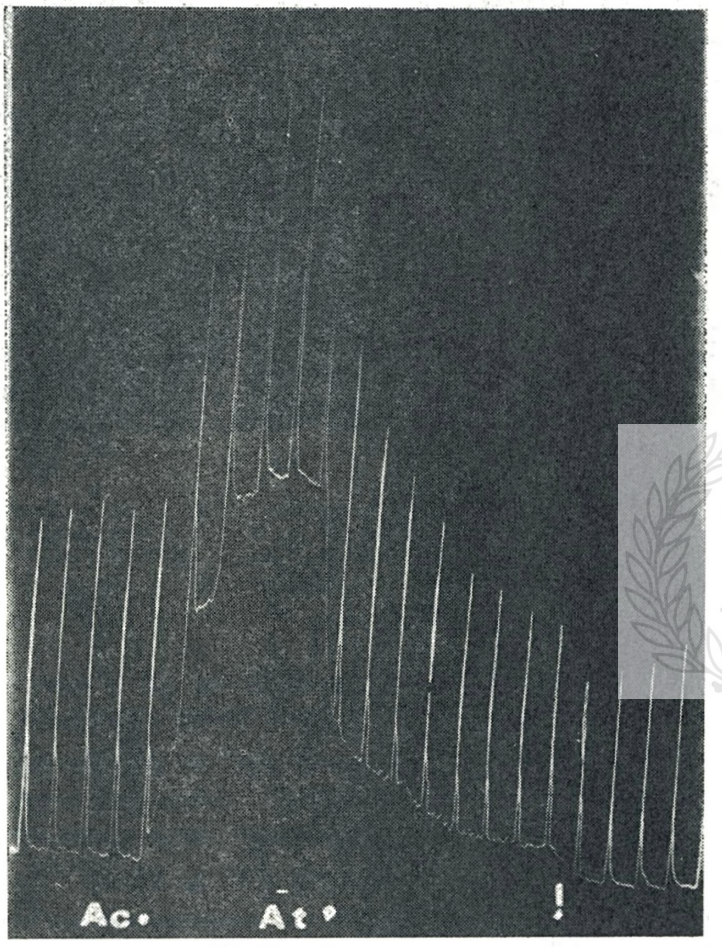
5. Acetilholin u koncentraciji $10^{-5}$ M dovodi do povećanja spazma i izazvanih kontrakcija. Povećanje spazma nije zavisno od istovremene stimulacije nerva, mada je pomenuto povećanje tonusa detrusora veće nakon 2—3 izazvane kontrakcije. Spazam koji se javlja nakon acetilholina ne utiče na relativnu 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.

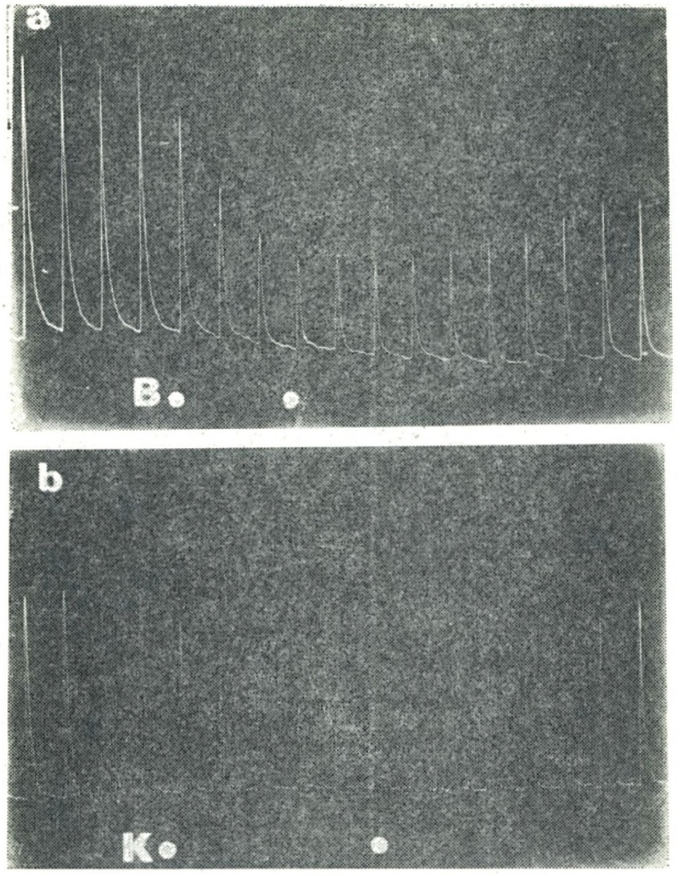



Slika 2.

*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.*

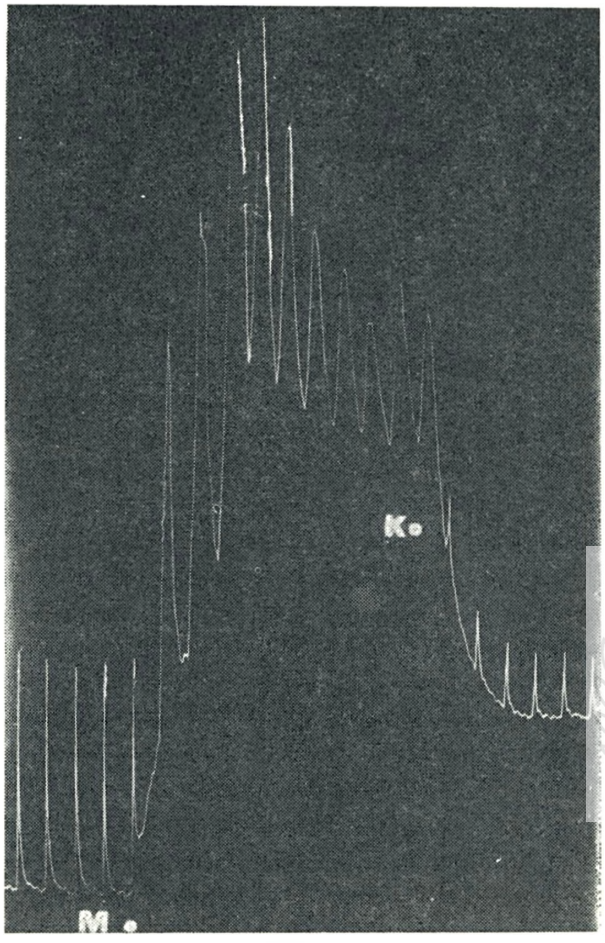
### *C. Uticaj holinolitika na kontrakcije mokraćne bešike posle antiholinesteraza i acetilholina*

Svi upotrebljeni holinolitici 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. A t r o p i n 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.

ANU BiH АНУ БиХ

2. K a r a m i l e n u koncentraciji $10^{-8}$ M smanjuje tonus i izazvane kontrakcije. Naročito spazmolitički deluje na spazam izazvan organofosfornim 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. B e n a k t i z i n u koncentraciji $10^{-10}$ do $10^{-9}$ M smanjuje spazam i izazvane kontrakcije (Sl. 1). Spada među najjače holinolitike. Naročito jako deluje na organe otrovane antiholinesterazama, izuzev somana. Efekat kod otrovanja somanom je ipak 10—100 puta jači od drugih holinolitika upotrebljenih u ovom eksperimentu.

4. T M B-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 MOKRAĆNU 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 medemo[11], dok kod somana[8, 12] i metilfluorofosforilholina[13] nije moguća. Reaktivacija nije moguća kod somana zbog procesa »starenja« kombinacije enzim-inhibitor i dealkilacije jednog radikala fosforilisanog enzima[8]. 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 delovanja[14].

Kako se vidi iz ovih rezultata, benaktizin jače deluje od atropina i karamifena. Cohen[15] 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 moguća[13], dok se enzim inhibisan somanom vrlo teško

reaktivira[12]. Berri i sar.[12] smatraju da se acetilholinesteraza inhibisana somanom teško reaktiviše 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-inhibitor[16] i njegove neadekvatne koncentracije[12], uzrok ovoj pojavi pripisuje i steričkim smetnjama[9].

Rezultati iz ovog rada su unekoliko različiti od rezultata istih autora[18], objavljenih 1968. godine. Statistička metoda $pB_{50}$, 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 holinoliticima nakon antiholinesteraza. Mislimo da je različiti rezultat uslovljen različitom tehnikom ispitivanja. Pri ispitivanju $pB_{50}$ infundirani su holinolitici postepeno, dok su u ovom eksperimentu injicirani odjedanput u punoj dozi.

## *ZAKLJUČAK*

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, wergrössern den Spasmus in ersten 1—3 Minuten und vermindern dann den hervorgerufenen Effekt der Nervenstimulation.

Exogenes Azetylcholin führt, an der mit Nerven isolierten Harnblase, Vergrösserung des Spasmus herbei, sowe 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. Devies 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. Tammelib: 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 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. Miletić: Jugoslav. Phisiol. Pharmac. acta, 4, 73 (1968).

ANU BiH АНУ БиХ