

Die Azetylcholinesterase an der motorischen Endplatte des Rattenzwerchfells nach Intoxikation mit Paraoxon und Soman bei Applikation von Oximen

Histochemische Untersuchungen zur Inhibierung der AChE durch die neurotoxischen Alkylphosphate Paraoxon (0,0-Diäthyl-*O*-(*p*-nitrophenyl)-phosphat und Soman (*O*-Pinakolyl-methylphosphonsäure-fluorid) demonstrieren, inwieweit Oxime in der Lage sind, diesen Prozess zu verhindern beziehungsweise zu beeinflussen. Die im Subneuralapparat der motorischen Endplatte lokalisierte AChE soll nach erfolgter Intoxikation möglichst schnell reaktiviert werden. WILSON und GINSBURG¹ synthetisierten das monoquaternäre Oxim 2-PAM (Pyridinium-2-aldoxim-N-methyl-jodid). Eine Durchdringung der Blut-hirnschranke ist dieser Verbindung nicht möglich. LÜTTRINGHAUS und HAGEDORN² fanden das Dioxim Toxogonin® (*Bis* [4-hydroxyiminomethyl-pyridinium-(1)-methyl]-äther). ENGELHARD und ERDMANN³, ERDMANN und ENGELHARD⁴, BISA et al.⁵ überprüften diese Verbindung auf ihre pharmakologische Wirkung. Toxogonin® hat gegenüber 2-PAM den Vorteil, dass es die Bluthirnschranke zu passieren vermag. SCHOENE⁶ konzipierte weitere bis-quaternäre Oxime, unter anderem HS 3 [(2-Hydroxyimino-methyl)-pyridinium-(1)-methyl] - [(4-hydroxyimino-methyl)-pyridinium-(1)-methyl]-äther-dichlorid, HS 6 [(2-Hydroxyimino-methyl)-pyridinium-(1)-methyl]-[(3-carbamoyl)-pyridinium-(1)-methyl]-äther-dichlorid und HS 9 [(2-Hydroxyimino-methyl)-pyridinium-(1)-methyl]-[(3-N-methylcarbamoyl)-pyridinium-(1)-methyl]-äther-dichlorid.

Material und Methodik. Weibliche Sprague-Dawley-Ratten (150–160 g), die unter standardisierten Bedingungen gehalten wurden, dienten als Versuchstiere. Die Inhibitoren Paraoxon (0,90 mg/kg Körpergewicht) und Soman (0,18 mg/kg Körpergewicht) injizierten wir i.p. (LD 50 nach LITCHFIELD und WILCOXON⁷). Die Dosierungen der Oxime und des Parasympathomimeticum Atropinum sulfuricum sind in der Tabelle beschrieben.

Die Albinoratten wurden im Ätherrausch abgetötet, die Zwerchfelle entnommen und zur Fixierung in eisgekühltes Baker-Formol über Nacht eingebracht. Zur histochemischen Darstellung der Endplattenesterase ist die Thioessigsäuremethode nach CREVIER und BÉLANGER⁸, WACHSTEIN, MEISEL und FALCON^{9,10} verwendet worden. Die Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank war mit

15–45 min bemessen. Nach Inkubation wurden die Totalpräparate entwässert und in Rhenohistol montiert.

Ergebnisse und Diskussion. Die AChE der motorischen Endplatte ist bis zu 30 min nach Verabreichung von Paraoxon uneingeschränkt darstellbar. 40 min nach Intoxikation hat eine Schwächung der Esterasereaktion zur granulären Struktur stattgefunden (Figur 1). Bei 50 min ist die vollständige Inhibierung eingetreten. Diesem Prozess ist eine irreversible Nekrose der die Endplatte umgebenden Muskelfasern eingeschlossen (Figur 2). Ohne Antidotapplikation ist nach 72 h die Reaktion der AChE wieder normal (Neubildung).

Der Reaktivator 2-PAM ist in der Lage, prophylaktisch oder therapeutisch gegeben, die Inhibierung der AChE bis auf eine Abschwächung der Esterase-Reaktion zwischen der 100. und 150. Minute nach Vergiftung zu verhindern. In diesem Zeitraum erscheint das Ferment deutlich granulär.

Toxogonin®, als sehr gut reaktivierendes Oxim, lässt etwa 70–80 min nach Applikation von Paraoxon eine granuläre Struktur der Endplattenesterase erkennen. Hierbei ist zu bemerken, dass Toxogonin® nur mit 1/10 der Dosierung von 2-PAM gegeben wurde. Bei Applikation der Substanz HS 3, die gleichfalls als guter Reaktivator gilt, sind keine Einbußen der AChE-Aktivität festzustellen. Dieser Befund gilt für Prophylaxe und Therapie.

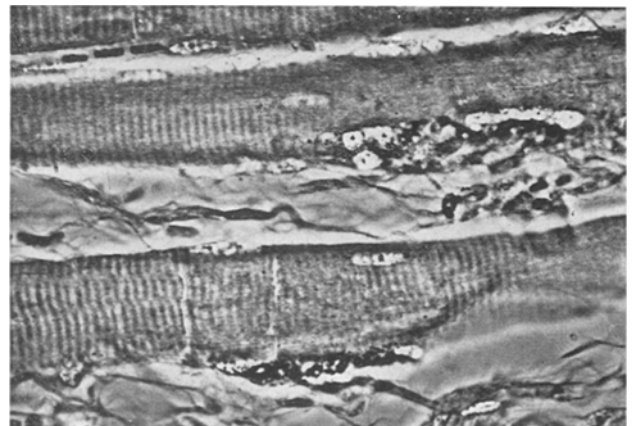


Fig. 1. Granuläre Struktur der Endplattenesterase 40 min nach Intoxikation mit Paraoxon. $\times 200$.

Dosierung der Oxime und des Parasympathomimeticum Atropinum sulfuricum

		i.m. Injek- tion des Oxims (15 min vor Paraoxon)	i.m. Injek- tion des Oxims (5 min nach Paraoxon)	i.m. Injek- tion des Oxims (5 min vor Soman)	i.m. Injek- tion des Oxims (1 min nach Soman)
2-PAM					
MG	264,1	9,0 mg/kg	9,0 mg/kg	–	–
Toxogonin®					
MG	359,2	0,90 mg/kg	0,90 mg/kg	–	–
HS 3					
MG	359,2	4,5 mg/kg	4,5 mg/kg	25,8 mg/kg	21,6 mg/kg
HS 6					
MG	359,2	–	–	9,6 mg/kg	9,6 mg/kg
HS 9					
MG	373,2	–	–	14,4 mg/kg	16,8 mg/kg
Atropin					
MG	694,9	–	–	9,0 mg/kg	9,0 mg/kg

¹ J. B. WILSON and D. GINSBURG, Biochim. biophys. Acta 78, 168 (1955).

² A. LÜTTRINGHAUS und I. HAGEDORN, Arzneimittel-Forsch. 14, 1 (1964).

³ H. ENGELHARD und W. D. ERDMANN, Klin. Wschr. 41, 525 (1963).

⁴ W. D. ERDMANN und H. ENGELHARD, Arzneimittel-Forsch. 14, 5 (1964).

⁵ K. BISA, G. FISCHER, O. MÜLLER, H. OLDIGES und E. ZOCH, Arzneimittel-Forsch. 14, 85 (1964).

⁶ K. SCHOENE, Dissertation, Freiburg (1967).

⁷ J. T. LITCHFIELD and F. WILCOXON, J. Pharmac. exp. Ther. 96, 99 (1949).

⁸ M. CREVIER and L. F. BÉLANGER, Science 122, 556 (1955).

⁹ M. WACHSTEIN, E. MEISEL and C. FALCON, J. Histochem. Cytochem. 9, 325 (1961).

¹⁰ M. WACHSTEIN, E. MEISEL and C. FALCON, Ann. Histochem. 6, 507 (1961).

Bei experimenteller Somanvergiftung sind die Oxime HS3, HS6 und HS9 unter Atropinschutz verwendet worden. HS3 kann nur bei prophylaktischer Gabe, vermutlich aufgrund der raschen Alterung des Enzyms, eine Hemmung der AChE bis etwa 40 min nach Vergiftung ausschliessen. HS6 vermag eine Inhibierung der Endplattenesterase durch Soman in keinem Fall zu beeinflussen. Abweichende Befunde ergeben sich bei Applikation von HS9 gegenüber dem genannten Phosphorsäureester. Therapeutisch gegeben, blieb das Ferment bis 200 min nach Intoxikation intakt. Die prophylaktische Anwendung von HS9 dagegen ergab nur eine Verzögerung der Esterasehemmung bis zu 100 min nach Vergiftung. Eine Applikation von Atropin allein ist ebenso wie die Kombination mit den Oximen 2-PAM und Toxogonin bei Somanvergiftung von geringer Bedeutung.

Die Esterasereaktivatoren sind Antidote, die den an das Ferment gebundenen Phosphorsäurerest wieder zu entfernen vermögen. Aus der Vielzahl der Arbeiten über dieses Problem sollen hier diejenigen von LOOMIS und SALAFSKY¹¹, ERDMANN¹² sowie HAHN und HENSCHLER¹³

genannt werden. Eine Grundforderung an die Oxime ist, das Zentralnervensystem zu erreichen. 2-PAM gelingt dies auch in hohen Dosierungen nicht. Für Toxogonin® wiesen ERDMANN¹⁴ und FALB und ERDMANN¹⁵ – letztere mit ¹⁴C markiertem Toxogonin® – Gehirnkonzentrationen nach. OLDIGES¹⁶ und ERDMANN¹² haben das Oxim HS6 auf seine pharmakologische Wirksamkeit untersucht. JONECKO¹⁷ untersuchte die Blockierung der Endplattenesterase am M. quadriceps femoris und der Zunge von Mäusen, ohne jedoch den Zeitpunkt der Inhibierung und Restitution näher zu bestimmen. Die Auswirkungen auf die Endplattenesterase bei Somanvergiftung beschrieb FISCHER¹⁸. ARIËNS, MEETER, WOLTHUIS und VAN BENTHEIM¹⁹ beschrieben reversible Nekrosen an der Endplatte nach Verabreichung von Cholinesteraseinhibitoren. Ultrastrukturelle Veränderungen der Endplatte nach intraperitonealer Applikation von Soman beschrieb PREUSSER²⁰.

Summary. The inhibition of AChE by Paraoxon is overcome by the application of the oximes 2-PAM, Toxogonin® and HS3. Soman inhibited AChE is affected only to a limited extent by HS3 and HS9.

G. FISCHER

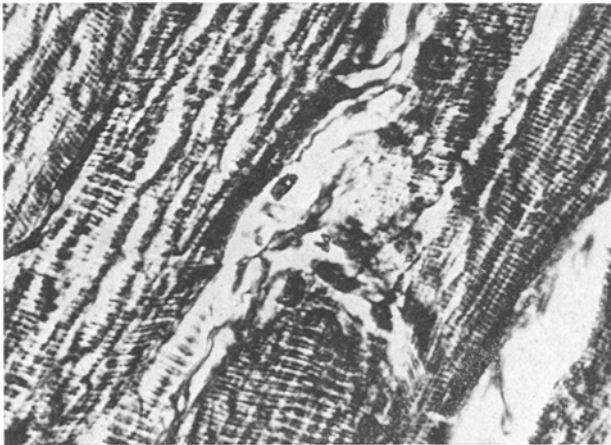


Fig. 2. Nekrose der Muskelfaser um die motorische Endplatte nach Vergiftung mit Paraoxon. $\times 250$.

Institut für Aerobiologie der Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V., D-5949 Graftschaff (Sauerland, Deutschland), 30. Oktober 1969.

- ¹¹ T. A. LOOMIS and B. SALAFSKY, *Toxic. appl. Pharmac.* 5, 685 (1963).
- ¹² W. D. ERDMANN, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.* 263, 61 (1969).
- ¹³ H. L. HAHN und D. HENSCHLER, *Arch. Tox.* 24, 147 (1969).
- ¹⁴ W. D. ERDMANN, *Arzneimittel-Forsch.* 15, 135 (1965).
- ¹⁵ A. FALB und W. D. ERDMANN, *Arch. Tox.* 24, 123 (1969).
- ¹⁶ H. OLDIGES, *Mündliche Mitteilung* (1966).
- ¹⁷ A. JONECKO, *Acta histochem.*, Jena 20, 39 (1965).
- ¹⁸ G. FISCHER, *Histochemie* 16, 144 (1968).
- ¹⁹ A. TH. ARIËNS, E. MEETER, O. L. WOLTHUIS and R. M. J. VAN BENTHEIM, *Experientia* 25, 57 (1969).
- ²⁰ H. J. PREUSSER, *Z. Zellforsch.* 80, 436 (1967).

Inhibition of Local Connective Tissue Repair in the Neoplastic Response to Water Soluble Carcinogens Administered Subcutaneously

Repeated s.c. injection in rats and mice is a recommended method for testing the carcinogenic activity of water-soluble chemical compounds. A wide variety of such substances have been shown capable of inducing sarcoma. These include glucose and sodium chloride administered in hypertonic solution^{1,2}, hydrochloric acid buffered at pH 5³, and a number of surface active or amphipathic food colourings². A multitude of experiments, some of which include detailed studies of the early lesion, indicate that the carcinogenic response appears to develop as a consequence of the local tissue reaction and as in the case of sarcoma induction by solid-state surfaces, is not a true index of carcinogenic activity.

Compared with this considerable amount of information on s.c. sarcoma induction by the agency of physical factors, little information is available on the tissue reaction and long-term results of repeated s.c. injection of

'true' carcinogens in aqueous solution, although such observations are extremely important in the study of the local mechanism of sarcoma production by carcinogens. Previous observations on the early effect of carcinogen injections used oily vehicles, and thus are not relevant comparisons, because of the formation of an oil granuloma and differences in the absorption rates of the vehicles.

In a study of the early local reaction and carcinogenic response to water-soluble carcinogens, 4-nitroquinoline-N-oxide (NQO), N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and

¹ M. CAPELLATO, *Tumori* 16, 38 (1942).

² P. GRASSO and L. GOLBERG, *Id Cosmet. Toxicol.* 4, 297 (1966b).

³ V. SUNTZEFF, R. S. BABCOCK and L. LOEB, *Am. J. Cancer* 39, 56 (1940).