



## Antidotski efekat kombinacija obidoksim/HI-6 i memantina kod miševa trovanih somanom, dihlorvosom ili heptenofosom

Antidotal effect of combinations obidoxime/HI-6 and memantine in mice poisoned with soman, dichlorvos or heptenophos

Biljana Antonijević\*, Miloš P. Stojiljković†, Dubravko Bokonjić‡,  
Slavica Vučinić‡

\*Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Katedra za toksikologiju, „Akademik Danilo Soldatović“, Beograd, Srbija; †Univerzitet u Istočnom Sarajevu, Medicinski fakultet, Institut za farmakologiju i toksikologiju, Foča, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina; ‡Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd, Srbija

### Apstrakt

**Uvod/Cilj.** Poseban problem pri trovanju organofosforinim jedinjenjima predstavljaju mišićne fascikulacije i konvulzije, koje se ne mogu u potpunosti antagonizovati primenom atropina i oksima. Cilj ovog rada bio je ispitivanje antidotskog efekta kombinacije memantina i oksima HI-6 kod trovanja somanom, kao i kombinacije memantina sa obidoksimom kod trovanja dihlorvosom i heptenofosom. **Metode.** Albino miševima, mužjacima, u repnu venu date su rastuće doze oksima i/ili memantina (10 mg/kg) u različitim vremenskim intervalima pre intravenskog (*iv*) davanja 1,3 LD-50 somana, dihlorvosa ili heptenofosa. Praćenjem stepena preživljanja, izračunate su srednje efektivne doze i poluvreme efikasnosti. U odvojenom eksperimentu praćena je cerebralna ekstrasvazacija boje Evans plavo (40 mg/kg *iv*) nakon primene memantina (10 mg/kg *iv*), midazolama (2,5 mg/kg intraoperitonealno – *ip*) i ketamina (20 mg/kg *ip*) 5 min pre davanja somana (1 LD-50 supkutano – *sc*). **Rezultati.** Primenom kombinacija sa memantinom srednje efektivne doze u nul-tom vremenu i HI-6 (7,96 *vs* 1,79  $\mu\text{mol/kg}$  kod trovanja somanom) i obidoksima (16,80 *vs* 2,75  $\mu\text{mol/kg}$  kod trovanja dihlorvosom; 21,56 *vs* 6,63  $\mu\text{mol/kg}$  kod trovanja heptenofosom) bile su višestruko niže u odnosu na dozu samog oksima. Memantin i midazolam uspešno su suprimirali prokonvulzivni efekat somana. **Zaključak.** Rezultati ove studije pokazuju da primena memantina u kombinaciji sa oksimima obezbeđuje bolji zaštitni efekat nego sam oksim, a u osnovi ovog efekta verovatno leži i njegov antikonvulzivni potencijal.

### Ključne reči:

organofosforna jedinjenja; trovanje; antidoti; oksimi; memantin; obidoksim hlorid; antikonvulzivi.

### Abstract

**Introduction/Aim.** In acute organophosphate poisoning the issue of special concern is the appearance of muscle fasciculations and convulsions that cannot be adequately antagonised by the use of atropine and oxime therapy. The aim of this study was to examine antidotal effect of obidoxime or HI-6 combinations with memantine in mice poisoned with soman, dichlorvos or heptenophos. **Methods.** Male Albino mice were pretreated intravenously (*iv*) with increasing doses of oximes and/or memantine (10 mg/kg) at various times before poisoning with 1.3 LD-50 of soman, dichlorvos or heptenophos, in order to determine the median effective dose and the efficacy half-time. In a separate experiment, cerebral extravasation of Evans blue dye (40 mg/kg *iv*) was examined after application of memantine (10 mg/kg *iv*), midazolam (2.5 mg/kg intraperitoneally – *ip*) and ketamine (20 mg/kg *ip*) 5 minutes before soman (1 LD-50 subcutaneously – *sc*). **Results.** Coadministration of memantine induced a significant decrease in median effective dose in null time of both HI-6 (7.96 *vs* 1.79  $\mu\text{mol/kg}$  in soman poisoning) and obidoxime (16.80 *vs* 2.75  $\mu\text{mol/kg}$  in dichlorvos poisoning; 21.56 *vs* 6.63  $\mu\text{mol/kg}$  in heptenophos poisoning). Memantine and midazolam succeeded to counteract the soman-induced proconvulsive activity. **Conclusion.** Memantine potentiated the antidotal effect of HI-6 against a lethal dose of soman, as well as the ability of obidoxime to antagonize the toxic effects of dichlorvos and heptenophos probably partly due to its anticonvulsive properties.

### Key words:

organophosphorus compounds; poisoning; antidotes; oximes; memantine; obidoxime chloride; anticonvulsants.

## Uvod

Uvođenjem Schraderovih organofosfornih jedinjenja (OFJ) nije samo unapređena borba protiv biljnih nametnika, već se uvećao i asortiman komercijalno dostupnih hemikalija kojima može da bude ugroženo zdravlje ljudi i domaćih životinja.

Organofosforna jedinjenja inhibiraju sve enzime tipa esteraza, a specifični su inhibitori acetilholinesteraze (AChE, prava holinesteraza, EC 3.1.1.7.) i butirilholinesteraze (ChE, pseudoholinesteraza, EC 3.1.1.8.)<sup>1</sup>. Takođe, poznato je da organofosforna jedinjenja imaju i direktne holinergičke efekte, da remete metabolizam i drugih neurotransmitera, da deluju na različite enzimске sisteme i direktno na ćelijske strukture<sup>2</sup>.

Specifična terapija trovanja organofosfornim jedinjenjima podrazumeva primenu atropina kao antagoniste muskarinskih receptora i oksima kao reaktivatora inhibirane holinesteraze. Međutim, pokazano je da oksimi poseduju nejednaku efikasnost pri trovanju organofosfatima različite hemijske strukture<sup>3</sup>. Poseban problem pri trovanju organofosfornim jedinjenjima predstavljaju mišićne fascikulacije i konvulzije, koje se ne mogu u potpunosti antagonizovati primenom atropina i oksima<sup>4,5</sup>. Mc Donough i sar.<sup>6</sup> i Shih<sup>7</sup> pokazali su da je centralna holinergička hiperstimulacija, pre svega supkortikalnih struktura (amigdalostrijatni kompleks), primarni i kritično važan činilac za nastajanje konvulzija u ranoj fazi akutnog trovanja organofosfornim jedinjenjima. Naknadni poremećaji ostalih neurotransmiterskih sistema (serotonin, kateholamini,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina – GABA, ekscitatorne amino kiseline i tzv. „sekundarni glasnici“ – ciklični guanozin-monofosfat), u velikoj meri odgovorni su za održavanje i propagaciju konvulzivne aktivnosti u centralnom nervnom sistemu (CNS-u)<sup>8-10</sup>, pa otuda i nije moguće u potpunosti kupirati takvu patološku aktivnost samo antiholinergicima. Benzodiazepini predstavljaju grupu antikonvulzivnih lekova koji se koriste u konvencionalnoj terapiji trovanja organofosfornim jedinjenjima<sup>11-13</sup>. Naime, benzodiazepini povećavaju afinitet i vezivanje  $\gamma$ -aminobuterne kiseline za GABA receptore, aktivacijom kojih dolazi do povećanja frekvencije otvaranja kanala za hloridni jon, što dalje ima za posledicu hiperpolarizaciju ćelijske membrane, odnosno inhibiciju postsinaptičke membrane<sup>14-16</sup>.

Drugi, takođe, važan neholinergički sistem, vezan za konvulzivnu aktivnost je sistem ekscitotoksičnih amino kiselina, glutamata i aspartata. Najviše ispitivana jedinjenja koja poseduju antagonistički efekat na N-metil-D-aspartat (NMDA) receptore su dizocilpin (MK-801), gaciklidin (GK-11) i ketamin<sup>5, 16-18</sup>.

Memantin-hidrohlorid (1-amino-3,5-dimetilaminoadamantan, Mem) je adamantanski derivat, koji je pod zaštitnim imenom Akatinol<sup>®</sup>, najpre u Nemačkoj, ušao u kliničku praksu kao lek protiv neurogenih motornih oboljenja i nekih drugih cerebralnih poremećaja<sup>19</sup>. Memantin deluje kao antagonist NMDA receptora<sup>20-22</sup>, čime je objašnjeno njegovo citoprotektivno delovanje u nizu eksperimentalnih modela, vezanih za ekscitotoksične aminokiseline<sup>23, 24</sup>. Memantin, dat u dozi od 18 mg/kg supkutano (*sc*) profilaktički zajedno

sa atropinom (16 mg/kg *sc*), sprečava konvulzije, nekrozu skeletnih mišića i smrt pacova trovanih tabunom, sarinom, somanom, VX otrovom ili DFP-om<sup>25</sup>. Tom prilikom saopšteno je i da predtretman memantinom smanjuje stepen inhibicije AChE raznih regija mozga i nekih skeletnih mišića kod pacova trovanih somanom. Od strane istih istraživača, usledila su ubrzo i ispitivanja profilaktičkog i terapijskog efekta memantina i atropina kod većeg broja antiholinesteraznih supstanci<sup>26-34</sup>.

Dosadašnja ispitivanja pokazala su da memantin, dat profilaktički, pojačava zaštitni efekat atropina pri trovanju karbamatima (aldikarb, karbofuran), nervnim bojnim otrovima i metil-parationom. Shodno tome, cilj ovog rada bio je ispitivanje antidotskog efekta kombinacije memantina i oksima HI-6 kod trovanja somanom, i kombinacije memantina sa obidoksimom kod trovanja dihlorvosom i heptenofosom.

## Metode

*Organofosfati i antidoti.* Soman (1,2,2-trimetilpropilmetilfosfonofluoridat) 98,5% sintetisan je u Odeljenju za hemijsku zaštitu Vojnotehničkog instituta, Beograd. Organofosforni insekticidi dobijeni su kao tehnički koncentрати: dihlorvos (DDVP), O,O-dimetil-O-(2,2-dihlorvinil)-fosfat 94,0%, ICN Galenika; heptenofos, 7-hlorebiciklo (3,2,0) hepta-2,6-dien-6-il-dimetil fosfat, 92,0%, Zorka, Šabac. Obidoksim (LüH-6), bis-(4-hidroksiiminometil-piridinijum)-1-metiletar dihlorid i HI-6, 1 - (2-hidroksiiminometil-piridinijum)-1-(4-karboksiamido-piridinijum)-dimetiletar dihlorid dobijeni su iz Vojnomedicinske akademije (VMA), Beograd. Čistoća korišćenih oksima analizirana je metodom HPLC/UV i iznosila je > 99%. Memantin, 1-amino-3,5-dimetil adamantan dobijen je kao poklon, zahvaljujući razumevanju dr Guentera Quacka, Merz+Co, GmbH & Co., Frankfurt/M, SR Nemačka. Sve ostale supstance bile su odgovarajućeg stepena čistoće i nabavljene su iz komercijalnih izvora.

*Eksperimentalna procedura.* U eksperimentima korišćeni su Albino miševi, mužjaci, telesne mase 18–24 g, dobijeni sa farme VMA, Beograd. Životinje su tokom eksperimenta držane pod standardnim laboratorijskim uslovima, sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Protokol ispitivanja odobrio je Etički komitet VMA, studija br. 282-12<sup>®</sup>, u skladu sa *Revised Geeide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Guide, volume 25, No 28, 1996)*. Sve ispitivane supstance davane su u repnu venu miševa u zapremini od 0,1 mL/20 g telesne mase. Organofosfati su primenjeni u dozi koja predstavlja minimalnu apsolutnu smrtnu dozu, (1,3 LD-50), a oksimi u dozama ne većim od polovine njihovih srednjih smrtnih doza (LD-50). U eksperimentima u kojima su oksimi primenjeni u kombinaciji sa memantinom, doza adamantana iznosila je 10 mg/kg.

U cilju određivanja LD-50/ED-50, eksperimentalnim životinjama (n = 5 u grupi) davane su rastuće doze (najmanje četiri doze) ispitivanih supstanci. Srednje efektivne doze (ED-50) određene su u vremenskim intervalima (1–60 min) nakon primene OFJ (1,3 LD-50). Životinje su brzo uginjavale, najduže za 5 min, a posle tog vremena do 24 sata nije

bilo novih uginjavanja. Na osnovu broja uginulih životinja u svakoj grupi i primenjenih doza, po metodi Litchfielda i Wilcoxon<sup>35</sup>, izračunate su LD-50 i ED-50, sa 95% granicama pouzdanosti.

Pad ED-50 u funkciji vremena matematički je definisan eksponencijalnom funkcijom. Logaritmovanjem eksperimentalno dobijenih ED-50<sub>t</sub> dobijena je linearna funkcija iz koje je bilo moguće izračunati odgovarajuću srednju efektivnu dozu u nultom vremenu (ED-50<sub>0</sub>, t = 0), odnosno dozu oksima koja bi obezbedila preživljavanje 50% eksperimentalnih životinja pri istovremenoj primeni otrova i antidota. Logaritmovanjem procentualno izraženih ED-50<sub>t</sub> vrednosti u funkciji vremena dobijena je linearna zavisnost na bazi koje je izračunato poluvreme efikasnosti, t<sub>1/2</sub> eff. = 0,693/a.

U delu eksperimenta u kome je ispitivan uticaj memantina na propustljivost hematoencefalne barijere pri trovanju somanom, korišćena je boja Evansovo plavo, u dozi od 40 mg/kg *iv*, za brzu vizuelizaciju cerebrovaskularne propustljivi-

gova akutna intravenska toksičnost bila manja od toksičnosti obidoksima.

Memantin je bio oko 2–3,6 puta toksičniji od oksima. Primenjen u dozi od 10 mg/kg u kombinacijama sa oksimima, memantin je potencirao njihovu toksičnost. Srednja smrtna doza HI-6 primenjenog u kombinaciji sa memantinom bila je 2,6 puta manja, nego kada je primenjivan sam. Srednja letalna doza kombinacije memantina sa obidoksimom bila je manja za 26,3% u odnosu na sam oksim. Erdmann<sup>45</sup> je za intravensku akutnu toksičnost obidoksima kod ženki miševa dobio LD-50 od 70 mg/kg (194,87 μmol/kg). Sličnu vrednost od 70 do 112 mg/kg (194,87–311,80 μmol/kg) objavio je i Wills<sup>46</sup>. Podatak koji se odnosio na intravensku akutnu toksičnost oksima HI-6 kod miševa mužjaka i iznosio 178 mg/kg (495,52 μmol/kg) nalazimo u radu Clementa<sup>47</sup>. U poređenju sa citiranim podacima, oksimi korišćeni u našem eksperimentu (tabela 1) bili su manje toksični, verovatno zbog veće čistoće primenjenih supstanci.

**Tabela 1**  
**Srednje intravenske smrtno doze (LD-50) oksima i/ili memantina (Mem)**

Preparat	LD-50 (95% granice pouzdanosti), μmol/kg	
	–	Oksim + Mem (10 mg/kg)
LüH-6	277,41 (211,46–363,91)	204,59 (168,95–245,57)
HI-6	496,80 (420,02–587,61)	189,86 (165,77–217,47)
Mem	135,99 (93,49–197,73)	–

vosti<sup>36–39</sup>. Boja je ubrizgavana 5 min pre supkutane primene 1 LD-50 doze somana (130 μg/kg). Grupama eksperimental-

Podaci o akutnoj intravenskoj toksičnosti primenjenih organofosfornih jedinjenja prikazani su u tabeli 2. U literatu-

**Tabela 2**  
**Srednje intravenske smrtno doze (LD-50) organofosfornih jedinjenja**

Organofosfat	LD-50 (95 % granice pouzdanosti), μmol/kg
Soman	0,27 (0,25–0,29)
Dihlorvos	22,17 (16,24–30,22)
Heptenofos	196,68 (163,72–208,41)

nih životinja (n = 10) 10 min pre somana intraperitonealno (*ip*) dat je midazolam 2,5 mg/kg<sup>13</sup> ili ketamin 20 mg/kg<sup>40–44</sup>, dok je memantin 10 mg/kg davan intravenski 5 min pre somana. Životinje su žrtvovane dekapitovanjem 30 min po ubrizgavanju somana, a izvađeni celi mozgovi čuvani su u 5% puferovanom formaldehidu do vizuelizacije intenziteta obojenosti mozgova.

*Statistička obrada podataka.* Relativni potencijal ispitivanih supstanci ili njihovih kombinacija izračunavan je putem 2 × 2 eseja (PHARM – *Pharmacologic Calculation System*, ver. 4.0, 1986 Springer-Verlag, New York, SAD). Za procenu značajnosti korišćena je jednofaktorska analiza varijanse koja je završavana Tukey-evim testom. Celokupna analiza rađena je pomoću komercijalnog statističkog paketa *Statistica 7.0*, StatSoft, Tulsa, Oklahoma, US.

## Rezultati

Akutna intravenska toksičnost oksima, memantina i njihovih kombinacija prikazana je u tabeli 1. Oksim HI-6 poznat je po niskoj toksičnosti, pa je i u ovom eksperimentu nje-

ri nalazimo podatak za intravensku srednju smrtnu dozu somana kod miševa, koja iznosi 35 μg/kg (0,19 μmol/kg)<sup>48</sup>. Jedini podatak o intravenskoj toksičnosti dihlorvosa kod miševa dali su Holmstedt i sar.<sup>49</sup>. Srednja letalna doza u navedenom radu iznosila je 8–10 mg/kg (36,10–45,25 μmol/kg). U dostupnoj literaturi nema podataka o LD-50 dozi heptenofosa kod miševa nakon intrevenske primene.

### Zaštitni efekti oksima i/ili memantina

Kod trovanja minimalnom apsolutnom smrtnom dozom somana (tabela 3), zaštitni efekat bilo je moguće postići primenom HI-6 samo do 60 min pre otrova, sa poluvremenom efikasnosti od 16,24 min i srednjom efektivnom dozom u nultom vremenu od 7,96 μmol/kg. Memantin, primenjen sam, štitio je miševe od 1,3 LD-50 somana kada se primeni najkasnije do 20 min pre otrova. U kombinaciji sa memantinom, HI-6 je štitio eksperimentalne životinje od trovanja somanom, ako se primeni do 40 min pre somana. Primenom kombinacije oksima HI-6 i memantina poluvreme efikasnosti bilo je kraće, ali je zato srednja efektivna doza u nultom vremenu bila skoro četverostruko niža u odnosu na vrednost samog HI-6.

**Tabela 3**  
**Zaštitni efekat HI-6 i/ili memantina ((Mem), 10 mg/kg iv) kod miševa trovanih somanom (1,3 LD-50 iv)**

t (min)	ED-50 <sub>t</sub> (95 % granice pouzdanosti), µmol/kg		
	HI-6	HI-6 + Mem	Mem
5	8,63 (7,68–9,69)	2,56 (0,86–4,52)	45,47 (35,97–57,33)
12,5			52,05 (45,98–58,91)
20	21,44 (19,10–24,05)	26,22 (17,84–38,44)	64,84 (51,96–100,76)
40	48,30 (40,59–57,46)	150,99 (99,88–228,27)	
60	93,45 (81,17–107,62)		
	ED-50 <sub>0</sub> (µmol/kg)		
	7,96	1,79	39,98
		t <sub>1/2</sub> eff. (min)	
	16,24	6,02	28,88

Zaštitni efekat obidoksima bilo je moguće ostvariti samo ako se primeni do 27,5 min pre dihlorvososa, dok je memantin štitio životinje od trovanja, ako se primeni najkasnije do 5 min pre otrova (tabela 4). Primenom memantina sa obidoksimom znatno je poboljšana zaštitni efekat oksima pri trovanju dihlorvosom, a srednja efektivna doza u nultom vremenu bila je višestruko manja.

*Uticaj memantina na propustljivost hematoencefalne barijere*

Antiholinesterazne supstance povećavaju propustljivost hematoencefalne barijere, a primena supstanci koje sprečavaju nastajanje i razvoj konvulzija smanjuje propustljivost barijere<sup>38, 50, 51</sup>. Step en obojenosti mozgov a procenjivan je

**Tabela 4**  
**Zaštitni efekti obidoksima i/ili memantina ((Mem), 10 mg/kg iv) kod miševa trovanih dihlorvosom (1,3 LD-50 iv)**

t (min)	ED-50 <sub>t</sub> (95 % granice pouzdanosti), µmol/kg		
	LüH-6	LüH-6 + Mem	Mem
5	23,08 (18,85–28,26)	4,06 (2,39–6,88)	52,47 (36,57–76,23)
12,5	34,58 (27,12–44,10)		
20	74,55 (59,88–92,84)	11,75 (6,68–24,27)	
27,5	89,84 (66,22–127,61)		
40		53,39 (30,29–94,21)	
	ED-50 <sub>0</sub> (µmol/kg)		
	16,80	2,75	–
		t <sub>1/2</sub> eff. (min)	
	10,72	9,38	–

Doza LüH-6 koja je potrebna za zaštitu 50% životinja pri istovremenoj primeni oksima i heptenofosa iznosila je 21,56 µmol/kg, sa poluvremenom efikasnosti od 10,56 min (tabela 5). Uključenjem i memantina značajno je poboljšana

vizuelizacijom: 0 (neobojen), 1+ (slabo plava boja), 2+ (plava boja), 3+ (jako plava boja). Po ubrizgavanju boje Evansovo plavo u kontrolnoj grupi nije se mogla uočiti prebojenost posmatranih sagitalnih preseka mozgov a (tabela 6).

**Tabela 5**  
**Zaštitni efekti LüH-6 i/ili memantina (Mem, 10 mg/kg iv) kod miševa trovanih heptenofosom (1,3 LD-50 iv)**

t (min)	ED-50 <sub>t</sub> (95 % granice pouzdanosti), µmol/kg		
	LüH-6	LüH-6 + Mem	Mem
5	37,39 (21,16–66,06)	7,27 (3,40–15,51)	40,79 (29,66–55,81)
12,5	46,85 (30,68–71,57)		
20	54,54 (36,50–81,43)	33,16 (24,02–45,74)	
27,5	184,93 (158,65–215,56)		
40		65,50 (39,53–108,46)	
	ED-50 <sub>0</sub> (µmol/kg)		
	21,56	6,63	–
		t <sub>1/2</sub> eff. (min)	
	10,56	11,31	–

zaštitni efekat oksima, a doza obidoksima koja je potrebna za zaštitu 50% životinja pri istovremenoj primeni oksima i heptenofosa bila je oko tri puta niža. Memantin je štitio eksperimentalne životinje, samo kada je bio primenjen do 5 min pre trovanja. Kada je davana kombinacija sa oksimom LüH-6, bilo je moguće ostvariti zaštitu životinja do 40 min predtretmana.

Nekoliko minuta po ubrizgavanju samo somana, uočena je pojava hipersalivacije, a 5–10 minuta po primeni somana i pojava tremora, istezanja ekstremiteta i pojave tzv. „Straubovog repa“. U grupi koja je tretirana somanom, šest od 10 životinja imalo je kliničke manifestacije konvulzija, dok u ostalim grupama nisu uočeni jasni znaci konvulzija. Uprkos tome, ekstravazacija boje uočena je u grupi koja je primila

**Tabela 6**  
**Uticaj memantina (10 mg/kg iv), midazolama (2,5 mg/kg ip) i ketamina (20 mg/kg ip)**  
**na propustljivost hematoencefalne barijere miševa trovanih somanom (1 LD-50 sc)**

Grupe	Intenzitet obojenosti mozgova			
	0	1+	2+	3+
Kontrola	10	0	0	0
Soman	0	1	3	6
Soman + midazolam*	4	4	2	0
Soman + ketamin <sup>‡</sup>	2	4	4	0
Soman + memantin <sup>†</sup>	7	3	0	0

Podaci u tabeli predstavljaju broj eksperimentalnih životinja

\* $p < 0,05$ ; <sup>†</sup> $p < 0,01$  u odnosu na grupu kojoj je dat samo soman;

<sup>‡</sup> $p < 0,01$  u odnosu na kontrolnu grupu

ketamin, nešto slabija u grupi tretiranoj midazolamom, a u grupi kojoj je ubrizgavan memantin samo je kod tri životinje uočena prebojenost veoma slabog intenziteta. Pri tom stepen prebojenosti sagitalnih preseka mozgova grupa koje su primile memantin ili midazolam statistički se značajno razlikovao od grupe koja je primila samo soman, ali ne i od kontrolne grupe, tj. grupe kojoj je data samo Evansovo plavo. Rezultati su pokazali da soman u značajnoj meri narušava integritet hematoencefalne barijere, a da se njena funkcija održava kada se memantin ili midazolam primene pet, odnosno deset minuta pre somana.

### Diskusija

Dosadašnja ispitivanja pokazala su da je HI-6 oksim izbora kod trovanja somanom, bez obzira na kom specijesu su vršena ispitivanja i koji eksperimentalni dizajn je sproveden, kao i da su trimedoksim i obidoksim efikasni kod većeg broja OF insekticida<sup>3, 52-58</sup>. Međutim, reaktivacija AChE mozga je izostajala ili je bila minimalna, te nije bilo moguće korelirati je sa zaštitnim efektom oksima<sup>3, 57</sup>.

U cilju poboljšanja centralnih efekata oksima i efikasnijeg antagonizovanja prokonvulzivne aktivnosti OFJ vršena su ispitivanja i supstanci koje su NMDA antagonisti, uključujući memantin. U ovom radu, ED-50<sub>0</sub> HI-6 datog sa memantinom kod trovanja somanom bila je nekoliko puta manja u odnosu na sam HI-6. Naši raniji nalazi pokazali su da je primena kombinacije memantina i oksima pri trovanju somanom značajno poboljšala i zaštitni efekat pralidoksima, trimedoksima i obidoksima, ili višestrukim smanjenjem srednje efektivne doze u nultom vremenu (pralidoksim i obidoksim), ili značajnim povećanjem poluvremena efikasnosti (trimedoksim)<sup>59, 60</sup>.

Memantin je primenjen i pri trovanju dihlorvosom i heptenofosom, ali u kombinaciji sa obidoksimom za koji je pokazano da je efikasan kod ovih insekticida<sup>61, 62</sup>. Kao i kod somana, pri trovanju dihlorvosom, odnosno heptenofosom, primenom memantina značajno je poboljšan zaštitni efekat oksima, dok je zaštitni efekat samog memantina bio relativno slab. Slični nalazi otvorili su pitanje mehanizama kojima bi se mogao objasniti mogući mehanizam dejstva memantina. Pretpostavljeno je da memantin štiti i/ili reaktivira AChE kako u perifernim tkivima, tako i u mozgu, odnosno da zaštitom karboksilesteraza dovodi do povećanja biodegradacije, a time i bioeliminacije otrova<sup>28-31, 34</sup>. U citiranim eksperimentima primenjene su subletalne doze OFJ, međutim, kada se

primene apsolutno smrtno doze OFJ, primena memantina nema uticaja na reaktivatorski potencijal oksima<sup>60, 63, 64</sup>.

Iako je kod pacova otrovanih somanom zaštitni indeks kombinacije atropina i HI-6 uvećan sa 2,14 na 4,70, a kombinacije atropin, HI-6 i diazepam sa 2,69 na 5,05, terapija oksimom HI-6 kod pacova predtretiranih memantinom nije dovela do značajnih promena aktivnosti AChE u mozgu, eritrocitima i dijafragmi u odnosu na efekte postignute kod životinja kojima je davan samo HI-6<sup>65</sup>. Istovremeno, navodimo da je u *in vitro* uslovima pokazano da su memantin kao i neki drugi derivati adamantana veoma slabi inhibitori i reaktivatori AChE eritrocita čoveka, inhibirane sarinom, somanom, tabunom i VX-om<sup>66</sup>. Stoga, verovatno je da se pri letalnom trovanju OF značajno bolji zaštitni efekat kombinacije ne može bazirati samo na reaktivaciji AChE, već da su za efekte memantina odgovorni i neki drugi mehanizmi delovanja. Zato je u ovom radu, u drugom delu eksperimenta, ispitivan efekat memantina na propustljivost hematoencefalne barijere pri trovanju somanom koji je modelna supstanca za izazivanje konvulzija. Organofosforna jedinjenja narušavaju integritet hematoencefalne barijere zbog činjenice da cerebrovaskularni endotel sadrži holinesteraze, te da povećani nivoi acetilholina indukuju promene na ćelijskim membranama<sup>50, 67</sup>. Ove promene, kao i samo otvaranje barijere zavise od intenziteta konvulzija, a smatra se da je u ovim uslovima subcelularni mehanizam prolaza kroz barijeru vezikularni transport, a ne raskidanje čvrstih veza između endotelnih ćelija<sup>38, 68</sup>. Stoga je u našem eksperimentu, indirektno, preko ekstravazacije boje, semikvantitativno ispitivan antikonvulzivni potencijal memantina i upoređen sa istim efektom midazolama i ketamina. Iako su i memantin i ketamin nekompetitivni antagonisti NMDA receptora, za razliku od memantina, ketamin je bio neefikasan<sup>43, 69</sup>. Midazolam je bio gotovo podjednako efikasan kao i memantin. Poznato je da su benzodiazepini efikasni antikonvulzivi, ali samo ako se primene najkasnije 5–10 min po nastanku konvulzija<sup>43, 70-72</sup>. Prema nekim ispitivanjima, hidrosolubilni midazolam čak je efikasniji od diazepama u zaštiti eksperimentalnih životinja od trovanja OF<sup>13, 73-75</sup>.

U studiji Deshpande i sar.<sup>76</sup> memantin (18 mg/kg sc) primenjen 1 h pre 0,9 LD-50 somana značajno je redukovao konvulzije, povećao preživljavanje pacova i zaštitio hipokampalne i kortikalne neurone u kulturi tkiva od ekscitotoksičnosti glutamata i aspartata. Primenjen profilaktički, memantin je u potpunosti antagonizovao pojavu tremora, mišićnih fascikulacija i konvulzija, ali nije štitiio od toksičnih mu-

skarinskih efekata pri trovanju aldikarbom, karbofuranom, metilparationom ili malationom<sup>27-31, 34</sup>.

### Zaključak

Rezultati ovog rada upućuju na zaključak da primena memantina u kombinaciji sa oksimima značajno snižava dozu oksima kojom se obezbeđuje zaštita pri trovanju apsolutno smrtnom dozom OF. Činjenica da memantin utiče na očuvanje integriteta hematoencefalne barijere ukazuje da, u osnovi ovog

efekta, verovatno, pored ostalog, leži i njegov antikonvulzivni potencijal. Međutim, profilisanje fenomena između oksima i memantina podrazumeva dalje opsežne mehanističke studije, kao i kvantitativno definisanje dobijenih efekata.

### Zahvalnica

Ovaj rad je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (projekat TR 20212A i III 46009).

## L I T E R A T U R A

1. *Sultatos LG*. Interactions of organophosphorus and carbamate compounds with cholinesterases. In: *Gupta CR*, editor. Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. New York: Elsevier; 2006; pp. 209–18.
2. *Ballantyne B, Marrs TC*. Overview of the biological and clinical aspects of organophosphates and carbamates. In: *Ballantyne B, Marrs TC*, editors. Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates. Oxford: Butterworth-Heinemann, Ltd; 1992. p. 3–14.
3. *Antonijević B, Stojiljković MP*. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *Clin Med Res* 2007; 5(1): 71–82.
4. *Sellström Å*. Anticonvulsants in anticholinesterase poisoning. In: *Ballantyne B, Marrs TC*, editors. Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates. Oxford: Butterworth-Heinemann, Ltd; 1992. p. 578–86.
5. *Weissman BA, Raveh L*. Therapy against organophosphate poisoning: The importance of anticholinergic drugs with antiglutamatergic properties. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 232(2): 351–8.
6. *Mc Donough JH Jr, McLeod CG Jr, Nipwoda MT*. Direct microinjection of soman or VX into the amygdala produces repetitive limbic convulsions and neuropathology. *Brain Res* 1987; 435(1–2): 123–37.
7. *Shih TM*. Anticonvulsant effect of diazepam and MK-801 in soman poisoning. *Epilepsy Res* 1990; 7(2): 105–16.
8. *Capacio BR, Shih TM*. Anticonvulsant action of anticholinergic drugs in soman poisoning. *Epilepsia* 1991; 32(5): 604–15.
9. *Shih TM, McDonough JH Jr*. Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. *J Appl Toxicol* 1997; 17(4): 255–64.
10. *Jacobson SO, Cassel GE, Karlsson BM, Sellstrom A, Persson SA*. Release of dopamine, GABA and EAA in rats during intrastriatal perfusion with kainic acid, NMDA and soman: a comparative microdialysis study. *Arch Toxicol* 1997; 71(12): 756–65.
11. *Gall D*. The use of the therapeutic mixtures in the treatment of cholinesterase inhibition. *Fundam Appl Toxicol* 1981; 1(2): 214–6.
12. *Inns RH, Leadbeater L*. The efficacy of bispyridinium derivatives in the treatment of organophosphate poisoning in guinea-pig. *J Pharm Pharmacol* 1983; 35(7): 427–33.
13. *Bokonić D, Rosić N*. Anticonvulsive and protective effects of diazepam and midazolam in rats poisoned by highly toxic organophosphorus compounds. *Arh Hig Rada Toksikol* 1991; 42(4): 359–65.
14. *Braestrup C, Squires RF*. Specific benzodiazepine receptors in the rat brain characterized by high affinity (3H) diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(9): 3805–9.
15. *Costa E, Guidotti A*. Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepines. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1979; 19: 531–45.
16. *Mc Donough JH Jr, Shih TM*. Pharmacological modulation of soman-induced seizures. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17(2): 203–15.
17. *Lallement G, Baubichon D, Clarencon D, Galonnier M, Peoc'h M, Carpentier P*. Review of the value of gacyclidine (GK-11) as adjuvant medication to conventional treatments of organophosphate poisoning: primate experiments mimicking various scenarios of military or terrorist attack by soman. *Neurotoxicology* 1999; 20(4): 675–84.
18. *Patocka J, Jun D, Bajgar J, Kuca K*. Prophylaxis against nerve agent intoxications. *Def Sci J* 2006; 56(5): 775–84.
19. *Wesemann W, Sontag KH, Maj J*. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of memantine. *Arzneimittelforschung* 1983; 33(8): 1122–34. (German)
20. *Bormann J*. Memantine is a potent blocker of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. *Eur J Pharmacol* 1989; 166(3): 591–2.
21. *Kornhuber J, Bormann J, Retz W, Hübers M, Riederer P*. Memantine displaces (3H)MK-801 at therapeutic concentrations in post-mortem human frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1989; 166(3): 589–90.
22. *Kornhuber J, Bormann J, Hübers M, Rusche K, Riederer P*. Effects of 1-amino-adamantanes at the MK-801-binding site of the NMDA-receptor-gated ion channel: a human postmortem brain study. *Eur J Pharmacol* 1991; 206(4): 297–300.
23. *Seif el Nasr M, Peruche B, Rossberg C, Mennel H-D, Kriegelstein J*. Neuroprotective effect of memantine demonstrated in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol* 1990; 185(1): 19–24.
24. *Erdő SL, Schäfer M*. Memantine is highly potent in protecting cortical cultures against excitotoxic cell death evoked by glutamate and N-methyl-D-aspartate. *Eur J Pharmacol* 1991; 198(2–3): 215–7.
25. *Gupta RC, McLean MJ, Dettbarn W-D*. Protection against nerve-agent induced central and peripheral toxicity. In: Proceedings of the Sixth Medical Chemical Defense Bioscience Review; 1987 Aug 4–6; Washington (DC): Aberdeen Proving Ground (MD): United States Army Medical Research Institute of Chemical Defense; 1987. p. 473–6.
26. *Gupta RC, McLean MJ, Dettbarn WD*. Prophylaxis and treatment against the toxicity of organophosphates (OP) compounds in rat by memantine and atropine. *Toxicologist* 1987; 7: 1103..
27. *Gupta RC, Kadel WL*. Prevention and antagonism of acute carbofuran intoxication by memantine and atropine. *J Toxicol Environ Health* 1989; 28(1): 111–22.
28. *Gupta RC, Kadel WL*. Methyl parathion acute toxicity: prophylaxis and therapy with memantine and atropine. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1990; 305(1–2): 208–21.
29. *Gupta RC, Kadel WL*. Novel effects of memantine in antagonizing acute aldicarb toxicity: Mechanistic and applied consideration. *Drug Dev Res* 1991; 24(4): 329–41.

30. Gupta RC, Kadel WL. Subacute toxicity of aldicarb: Prevention and treatment with memantine and atropine. *Drug Dev Res* 1991; 24(4): 343–53.
31. Gupta RC, Detham WD. Potential of memantine D-tubocurarine, and atropine in preventing acute toxic myopathy induced by organophosphate nerve agents: soman, sarin, tabun and VX. *Neurotoxicology* 1992; 13(3): 649–61.
32. Gupta RC, Goad JT, Kadel WL. Protection and reversal by memantine and atropine of carbofuran-induced changes in biomarkers. *Drug Dev Res* 1993; 28(2): 153–60.
33. Gupta RC. Carbofuran toxicity. *J Toxicol Environ Health* 1994; 43(4): 383–418.
34. Gupta RC, Goad JT. Role of high-energy phosphates and their metabolites in protection of carbofuran-induced biochemical changes in diaphragm muscle by memantine. *Arch Toxicol* 2000; 74(1): 13–20.
35. Litchfield JT, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 1949; 96(2): 99–113.
36. Fredericks WR, Rapoport SI. Reversible osmotic opening of the blood-brain barrier in mice. *Stroke* 1988; 19(2): 226–8.
37. Wiranowska M, Wilson TC, Bencze KS, Prockop LD. A mouse model for the study of blood-brain permeability. *J Neurosci Methods* 1988; 26(2): 105–9.
38. Petrali JP, Maxwell DM, Lenç DE, Mills KR. Effect of an anticholinesterase compound on the ultrastructure and function of the rat blood-brain barrier: a review and experiment. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1991; 23(2): 331–8.
39. Moos T, Møllgaard K. Cerebrovascular permeability to azo dyes and plasma proteins in rodents of different ages. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993; 19(2): 120–7.
40. Cohen ML, Trevor AJ. On the cerebral accumulation of ketamine and the relationship between metabolism of the drug and its pharmacological effects. *J Pharmacol Exp Ther* 1974; 189(2): 351–8.
41. Palmer GC, Harris EW, Ray R, Stagnitto ML, Schmiesing RJ. Classification of compounds for prevention of NMDLA-induced seizures/mortality, or maximal electroshock and pentylenetetrazol seizures in mice antagonism of MK801 binding in vitro. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1992; 317: 16–34.
42. Mealing GA, Lanthorn TH, Murray CL, Small DL, Morley P. Differences in degree of trapping of low-affinity uncompetitive N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonists with similar kinetics of block. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288(1): 204–10.
43. Shih T, Mc Donogh JH Jr, Koplavitz I. Anticonvulsants for soman-induced seizure activity. *J Biomed Sci* 1999; 6(2): 86–96.
44. Dorandeu F, Carpentier P, Baubichon D, Four E, Bernabe D, Burckhart MF et al. Efficacy of the ketamine atropine combination in the delayed treatment of soman-induced status epilepticus. *Brain Res* 2005; 1051(1–2): 164–75.
45. Erdmann WD. A new antidote principle for the treatment of alkylphosphate poisoning. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 1969; 263(1): 61–72. (German)
46. Wills JH. Recent studies on organic phosphate poisoning. *Fed Proc* 1959; 18: 1020–5.
47. Clement JG. Effect of fasting on the acute toxicity of HI-6 and its efficacy in soman poisoned mice. *Fund Appl Toxicol* 1982; 2(2): 88–9.
48. Brezenoff HE, McGee J, Knight V. The hypertensive response to soman and its relation to brain acetylcholinesterase inhibition. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1984; 55(4): 270–7.
49. Holmstedt B, Nordgren I, Sandoz M, Sundvall A. Metrifonate. Summary of toxicological and pharmacological information available. *Arch Toxicol* 1978; 41(1): 3–29.
50. Ashani Y, Catravas GN. Seizure-induced changes in the permeability of the blood-brain barrier following administration of anticholinesterase drugs to rats. *Biochem Pharmacol* 1981; 30(18): 2593–601.
51. Carpentier P, Delamanche IS, Le Bert M, Blanchet G, Bouchaud C. Seizure-related opening of the blood-brain barrier induced by soman; Possible correlation with the acute neuropathology observed in poisoned rats. *Neurotoxicology* 1990; 11(18): 493–508.
52. Bošković B. The treatment of soman poisoning and its perspectives. *Fund Appl Toxicol* 1981; 1(2): 203–13.
53. Rousseaux CG, Drua AK. Pharmacology of HI-6, an H-series oxime. *Can J Physiol Pharmacol* 1989; 67(10): 1183–9.
54. Dawson RM. Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *J Appl Toxicol* 1994; 14(5): 317–31.
55. Kassa J. A comparison of the efficacy of new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with other oximes (obidoxime, HI-6) against soman in rats. *Hum Exp Toxicol* 1998; 17(6): 331–5.
56. Antonijević B, Bokunjić D, Stojiljković MP, Kilibarda V, Milovanović ZA, Nedeljković M, et al. Efficacy of trimedoxime in mice poisoned with dichlorvos, heptenophos or monocrotophos. *Basis Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96(2): 111–7.
57. Jokanović M, Stojiljković MP. Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *Eur J Pharmacol* 2006; 553(1–3): 10–7.
58. Jokanović M. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicol Lett* 2009; 190(2): 107–15.
59. Antonijević B, Stojiljković MP, Maksimović M, Nedeljković M, Đukić M. Adamantane derivatives and oxime HI-6 in mice poisoned with soman. *Arch Toxicol Kinet Xenobiot Metab* 1998; 6(4): 747–50.
60. Antonijević B, Maksimović M, Kilibarda V, Stojiljković MP, Nedeljković M, Milovanović Z, et al. Potential beneficial action of adamantanes in mice poisoned with soman. *Arch Toxicol Kinet Xenobiot Metab* 2001; 9(1–2): 13–20.
61. Jokanović M, Maksimović M. A comparison of trimedoxime, obidoxime, pralidoxime and HI-6 in the treatment of oral organophosphorus insecticide poisoning in the rat. *Arch Toxicol* 1995; 70(2): 119–23.
62. Antonijević B, Maksimović M, Nedeljković M, Đukić M. Efficacy of obidoxime against organophosphorus insecticides in mice. XXXVII European Congress of Toxicology – EUROTOX '99; 1999 June 27–30; Norway, Oslo: *Toxicol Lett*; 1999; 1(109): 104.
63. Antonijević B, Maksimović M, Stojiljković MP, Nedeljković M, Đukić M. Protective effects of pyridinium oximes and memantine in mice poisoned with heptenophos. *Arch Toxicol Kinet Xenobiot Metab* 1998; 6(3): 307–8.
64. Antonijević B, Maksimović M, Stojiljković PM, Nedeljković M, Đukić M. Protective effects of memantine and pyridinium oximes in mice poisoned with dichlorvos. *Arch Toxicol Kinet Xenobiot Metab*; 2000; 8(3): 216–7.
65. Stojiljković MP. Memantine or its metabolite 1-amino-3-hydroxymethyl-5-methyl adamantane (Mrz 2/373) afford better prophylaxis than physostigmine or pyridostigmine in soman-intoxicated rats. *Arch Toxicol Kinet Xenobiot Metab* 1997; 5(1): 35–9.
66. Bregovec I, Maksimović M, Kilibarda V, Binenfeld Z. Adamantane derivatives as potential reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds. *Acta Pharmaceutica* 1992; 42(3): 251–3.
67. Fauvelle F, Dorandeu F, Carpentier P, Foquin A, Rabeson H, Graveron-Demilly D, et al. Changes in mouse brain metabolism following a convulsive dose of soman: A proton HRMAS NMR study. *Toxicology* 2010; 267(1–3): 99–111.
68. Grange Messent V, Bouchaud C, Jamme M, Lallement G, Foquin A, Carpentier P. Seizure-related opening of the blood-brain barrier produced by the anticholinesterase compound, soman: new ultrastructural observations. *Cell Mol Biol Noisy le grand*. 1999; 45(1): 1–14.

69. *Dorandeu F, Baille V, Mikler J, Testylier G, Lallement G, Sawyer T*, et al. Protective effects of S(+) ketamine and atropine against lethality and brain damage during soman-induced status epilepticus in guinea-pigs. *Toxicology* 2007; 234(3): 185–93.
70. *Clement JG, Broxup B*. Efficacy of diazepam and avizafone against soman-induced neuropathology in brain of rats. *Neurotoxicology* 1993; 14(4): 485–504.
71. *Anderson DR, Harris LW, Chang FC, Baze WB, Capacio BR, Byers SL*, et al. Antagonism of soman-induced convulsions by midazolam, diazepam and scopolamine. *Drug Chem Toxicol* 1997; 20(3): 115–31.
72. *McDonough JH Jr, Zoefel LD, McMonagle J, Copeland TL, Smith CD, Shih TM*. Anticonvulsant treatment of nerve agent seizures: anticholinergics versus diazepam in soman-intoxicated guinea pigs. *Epilepsy Res* 2000; 38(1): 1–14.
73. *Krutak-Krol H, Domino EF*. Comparative effects of diazepam and midazolam on paraoxon toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 81(3 Pt 1): 545–50.
74. *Domino EF*. Comparative seizure inducing properties of various cholinesterase inhibitors: Antagonism by diazepam and midazolam. *Neurotoxicology* 1987; 8(1): 113–22.
75. *McDonough JH Jr, McMonagle J, Copeland TL, Zoefel LD, Shih TM*. Comparative evaluation of benzodiazepines for control of soman-induced seizures. *Arch Toxicol* 1999; 73(8–9): 473–8.
76. *Deshpande SS, Smith CD, Filbert MG*. Assessment of primary neuronal culture as a model for soman-induced neurotoxicity and effectiveness of memantine as a neuroprotective drug. *Arch Toxicol* 1995; 69(6): 384–90.

Primljen 5. III 2010.  
Prihvaćen 24. III 2010.