

VIII. VAJA: TOKSIČNOST INSEKTICIDOV ZA ŽIVALI, HOLIDNOMIMETIKI, INHIBITORJI ACETILHOLINESTERAZE

NALOGA

Prikaz delovanja organofospornih insekticidov na organizem in diferenciacija nikotinskih in muskarinskih učinkov. Prikaz metode hitrega določanja aktivnosti acetilholinesteraze.

OSNOVE

Inhibitorji acetilholinesteraze

Holinesteraze

To so serinske hidrolaze, aktivno mesto > 10.000 molekul Ach/s, zato Ach v krvi praktično ne moremo meriti.

Acetilholinesteraza (AChE):

Vezana je na BM v holineričnih sinapsah, vezana je tudi na eritrocitno membrano idr. V holineričnih živčnih končičih je tudi topna oblika, drugače je pa AChE specifična za Ach in sorodne estre.

Butirilholinesteraza:

Nahaja se v tkivih (jetra, koža, CŽS, gladka mišičnina v prebavi), v plazmi pa kot topna oblika. Je manj specifična od acetilholinesteraze, saj razgrajuje butirilholin, acetilholin, prokain, suksametonij idr.

Poznamo več vrst inhibitorjev:

- **kratkotrajni zaviralci:** tvorijo ionsko vez, ki lahko hitro razpade, uporabljamo v diagnostične namene (drofonij)
- **srednji zaviralci:** karbamilacija (neostigmin, piridostigmin, fizostigmin)
- **nepovratni zaviralci:** fluoridna ali organofosforna skupina se sprosti, preostanek je vezan, preko fosforja, kovalentno na –OH skupino v serinskem preostanku encima; niso specifični

Učinki inhibitorjev:

- holinerične sinapse v avtonomnem živčevju: povečano izločanje slinskih, solznih, bronhialnih žlez in žlez v gastrointestinalnem traktu, povečana peristaltika, bronhokonstrikcija, bradikardija in zmanjšanje krvnega pritiska
- motorična ploščica: pretirana vzdraženost in krčenje mišic, tremor (tresenje), fascikulacije (valovanje dlake), blokada depolarizacije
- OŽS: vzburjenje, kasneje depresija, nezavest in prenehanje dihanja
- Nevrotoksičnost: demielinizacija perifernih živcev

Metrifonat (Neguvon)

Je nepovratni zaviralec acetilholinesteraze. Uporablja se ga kot antiparazitik za zunanjo in peroralno uporabo različnih živali (konj, govedo, drobnica, prašiči, perutnina). Je v obliki praška s katerim pripravimo suspenzijo za dermalni ali peroralni vnos. Prednost je, da se skozi nepoškodovano kožo dobro resorbira in ima hitro biotransformacijo.

Atropin

Je antimuskarinsko zdravilo, ki se absorbira skozi sluznico gastrointestinalnega trakta, 85% se izloči z urinom v 24 urah, od tega polovica v nespremenjeni obliki. Terapijski učinek na očesu pa lahko traja do 7 dni. Veže se muskarinske receptorje, ima večjo afiniteto kot Ach, ne vpliva pa na izločanje Ach v sinaptično špranjo.

Delovanje:

- spazmolitično: relaksacija gl. mišic
- blokira sekrecijo eksokrinih žlez
- centralni učinki: z večanjem doz atropina pride do vrtoglavice, razdraženja, delirija, globoke nezavesti in kome z depresijo dihanja ter do amnezije.

Določanja aktivnosti acetilholinesteraze:

1. BTB metoda določanja aktivnosti acetilholinesteraze
2. Elektrometrična metoda določanja aktivnosti acetilholinesteraze

Metodi temeljita na ugotavljanju proste očetne kisline, ki se sprošča pri reakciji acetilholin – acetilholinesteraza.

POTREBŠČINE

Zdravilo:

- Metrifonat
- Atropin

Pribor:

- brizgalke in igle
- vatiranci
- alkohol
- kirurške škarje
- kanila
- kunec

DELO

Kunec ima 4,53 kg

Metrifonat (triklorfonat)

Doziranje: 150 mg/kg telesne mase

Koncentracija: 15%

Račun: $150 \text{ mg/kg} \times 4,53 \text{ kg} = 679,5 \text{ mg}$

$679,5 \text{ mg} : 0,15 = 4530 \text{ mg} = 4,53 \text{ g}$

$1 \text{ g/1ml} \Rightarrow 4,53 \text{ g} = 4,53 \text{ ml} \sim \mathbf{4,5 \text{ ml}}$

Atropin

Doziranje: 2 mg/kg telesne mase

v steklenički: 1 mg/ml

račun: $2 \text{ mg/kg} \times 4,53 \text{ kg} = 9,06 \text{ mg}$

$1 \text{ mg/1ml} \Rightarrow 9,06 \text{ mg} = 9,06 \text{ ml} \sim \mathbf{9 \text{ ml}}$

□ **BTB metoda določanja aktivnosti acetilholinesteraze (samo teoretično):**

Kuncu vzamemo 1 ml krvi, ki ji dodamo natrijev citrat. Nato kuncu intramuskularno vbrizgamo 4,5 ml metrifonata in počakamo, do pojava holineričnih simptomov, ki jih poskušamo razdeliti na muskarinske, nikotinske in centralne. Ko so simptomi maksimalno razviti, kuncu zopet odvzamemo 1 ml krvi. Po odvzemu krvi kuncu počasi intravenozno vbrizgavamo atropin, dokler se zenici ne razširita na normalno. Takrat prenehamo z vbrizgavanjem, vzamemo 1 ml krvi in preostanek atropina (preostanek od 9 ml) vnesemo subkutano.

- | | |
|---|---|
| 1. Epruveta – poskus
modra vsebina | 1,0 ml BTB (indikator)
0,04 ml eritrocitov (kri)
0,50 ml Ach |
| 2. Epruveta – slepi poskus
rdeča vsebina | 1,0 ml BTB
0,04 ml eritrocitov (kri)
0,15 ml očetne kisline
0,35 ml vode |

Pri tej metodi ugotavljamo čas, ki je potreben, da modra barva indikatorja preide v rdečo, kot je v slepem poskusu (prisotnost očetne kisline).

Aktivnost AchE = fiziološka aktivnost x 100/ inhibirana aktivnost

□ **Pojav kliničnih znakov zastrupitve**

Kuncu v ušesno veno uvedemo kanilo, to območje prej primerno pripravimo; t.j. ostrižemo in razkužimo. Enako pripravimo tudi dve mesti na telesu za intramuskularni vnos 4,5 ml metrifonata (strup). Počakamo, do pojava kliničnih znakov zastrupitve, ki jih definiramo na muskarinske in nikotinske. Ko se simptomi maksimalno razvijejo, kuncu počasi intravenozno vbrizgavamo atropin, dokler se zenici ne razširita na normalno. Takrat prenehamo z vbrizgavanjem atropina in ostanek (preostanek od 9 ml) vnesemo subkutano.

REZULTAT

Po vnosu metrifonata, so se na kuncu začeli pojavljati klinični znaki zastrupitve.

- Najprej so se pojavili **muskarinski simptomi**: povečano izločanje iz eksokrinih žlez (slinske, solzne, bronhialne), povečana peristaltika in bradikardija
- Kasneje so se pojavili še **nikotinski simptomi**: vzbujenje, pretirana vzdraženost mišic, krči, tresenje in valovanje dlake.

Zenici sta se vseskozi počasi ožili in pri njuni najmanjši velikosti smo začeli intravenozno aplicirati atropin, da bi preprečili popolno zastrupitev in smrt. Po dodatku približno 2 ml atropina sta se zenici normalno razširili, ostalo smo aplicirali subkutano.