

Aus dem Walther-Straub-Institut für
Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann
(chem. komm. Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Elmar Richter)

Wirkung von Bispyridiniumoximen und Atropin
am isolierten Meerschweinchenherz
nach Langendorff

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katja Will
aus
Plattling

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Franz Worek

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Wolfgang Leber

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2008

Meinen Eltern gewidmet

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. P. Eyer, ehemaliger komm. Vorstand am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, möchte ich für die Genehmigung und Befürwortung meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. L. Szinicz, ehemaliger Institutsleiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr, danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten zur Versuchsdurchführung.

Meinem verehrtem Doktorvater, Herrn PD Dr. F. Worek, gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung, für die zahlreichen wertvollen Anregungen und Diskussionen, für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Versuche sowie die großzügige Unterstützung und das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herzlichst danken möchte ich schließlich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Zusammenarbeit bei der praktischen Durchführung der Versuche.

Meinen Eltern und meinem Mann gilt ebenfalls ein herzliches Dankeschön für die liebevolle und tatkräftige Unterstützung und Geduld über die ganze Zeit hinweg.

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	8
1. Substanzen	
1.1. Allgemein verwendete Substanzen	8
1.2. Substanzen zur Herstellung der Krebs-Ringer-Bicarbonat Lösung (KRB)	8
1.3. Substanzen für die HPLC zur ATP- und cAMP-Messung	9
2. Geräte	
2.1. Langendorff-Apparatur mit Messeinheit	10
2.2. HPLC-Aufbau	11
2.3. ATP- und cAMP-Messung	11
2.4. Firmenregister	12
3. Methoden	
3.1. Das isolierte perfundierte Meerschweinchenherz nach Langendorff	13
3.1.1. Herstellung des KRB-Puffers	13
3.1.2. Präparation der Meerschweinchen	14
3.1.3. Versuchsaufbau	15
3.1.4. Versuchsdurchführung	17
3.2. ATP- und cAMP-Messung	23
3.3. HLö 7-Messung in Perfusatproben	24
3.4. Datenauswertung und Datendarstellung	24
III. ERGEBNISSE	25
1. Eigenwirkung von Atropin, Obidoxim, HI 6 und HLö 7 bei unterschiedlichen Konzentrationen	
1.1. Eigenwirkung von Atropin	25
1.2. Eigenwirkung von Obidoxim	30
1.3. Eigenwirkung von HI 6	30
1.4. Eigenwirkung von HLö 7	33
1.5. Vergleich der Oxime Obidoxim, HI 6 und HLö 7	36
2. Wechselwirkung von Atropin mit den Bispyridiniumoximen	
2.1. Wirkung von Atropin in Kombination mit Obidoxim	39
2.2. Wirkung von Atropin in Kombination mit HI 6	39
2.3. Wirkung von Atropin in Kombination mit HLö 7	39

3. Wirkung der Antidote in Gegenwart von 100 μ M Soman	
3.1. Wirkung von Soman bei kumulativer Dosierung	44
3.2. Wirkung von Soman und Atropin	46
3.3. Wirkung von Soman und Obidoxim	46
3.4. Wirkung von Soman und HLö 7	46
4. Direkte Wirkung verschiedener Organophosphate und Carbamate	
4.1. Wirkung auf Sinusfrequenz und Ventrikelfrequenz	50
4.2. Wirkung auf die linksventrikuläre Druckamplitude	50
5. Wirkung von HLö 7 und HI 6 auf den ATP- und cAMP-Spiegel	
5.1. ATP- und cAMP-Spiegel im Herzmuskel	54
5.2. HLö 7-Spiegel im Perfusat	54
IV. DISKUSSION	57
V. ZUSAMMENFASSUNG	68
VI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	70
VII. ABKÜRZUNGEN	72
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	73

I. EINLEITUNG

Trotz mehrerer Abkommen, die den Einsatz Chemischer Waffen verbieten (Konferenz von Den Haag 1899/1907, Genfer Protokoll 1925, Konvention über chemische Waffen 1993), haben jüngste Konflikte gezeigt, daß Chemische Waffen nach wie vor eine ernste Bedrohung für Soldaten und Bevölkerung darstellen (Sipri 1971, Marshall 1984, Tokio 1995).

Aufgrund ihrer hohen inhalativen und perkutanen Toxizität stellen Nervenkampfstoffe die gefährlichste Gruppe Chemischer Waffen dar (Carnes und Watson 1989, Dunn und Sidell 1989).

Allen Organophosphaten ist eine Grundstruktur gemeinsam, die 1937 von G. Schrader erkannt worden war:

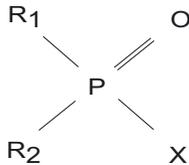


Abb. 1: Grundstruktur der Organophosphate nach Schrader,
R = Alkyl-, Alkoxy- o. Dialkylamidgruppe,
X = Säurerest

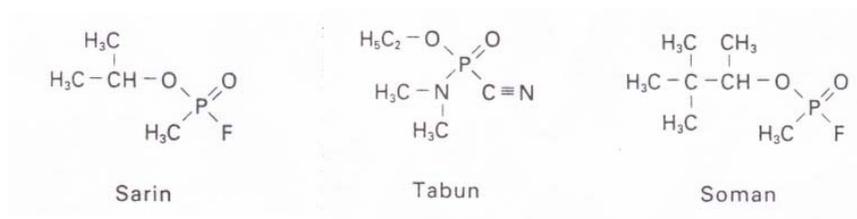


Abb. 2: Strukturformel von Soman, Sarin und Tabun

Die Weiterentwicklung der Organophosphate zielte darauf ab, einen dem Acetylcholin (Transmitter) ähnlichen Stoff zu finden. So entstanden die sogenannten V-Stoffe, von denen das VX ein besonders toxischer Vertreter ist.

Folgende Struktur zeigt die Ähnlichkeit von VX und Acetylcholin (ACh):

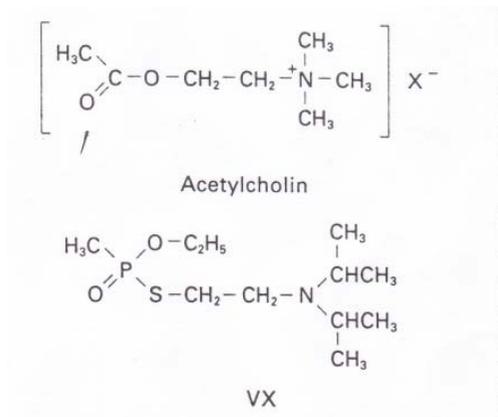


Abb. 3: Strukturformel von Acetylcholin (ACh) und dem Organophosphat VX

Bei Zimmertemperatur sind diese Stoffe Flüssigkeiten. Sie können schnell über die Atemwege, den Magen-Darm-Trakt oder die Haut in den Organismus eindringen und werden dort rasch überall (auch in das ZNS) verteilt.

Organophosphate sind hochgiftige Substanzen, die die Enzyme Acetylcholinesterase (AChE) und Butyrylcholinesterase (BChE) durch Phosphorylierung bzw. Phosphonylierung der Serinhydroxylgruppe im esteratischen Zentrum irreversibel hemmen. Soman bindet z.B. an die OH-Gruppe des Serins im esteratischen Teil des aktiven Zentrums der AChE (Abb. 5). Dadurch wird der Abbau von Acetylcholin (ACh) vermindert, und es kommt zu einem Anstau dieses Neurotransmitters an cholinergen Synapsen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie an den neuromuskulären Endplatten der Skelettmuskulatur.

Der Acetylcholinanstau bestimmt nach heutiger Kenntnis im wesentlichen das Vergiftungsbild, das sich pharmakologisch in muskarinartige (durch Atropin hemmbar) und nikotinartige (durch Atropin nicht hemmbar) Effekte differenzieren läßt. Die einzelnen Symptome der Organophosphatvergiftung sind in Abb. 4 dargestellt.

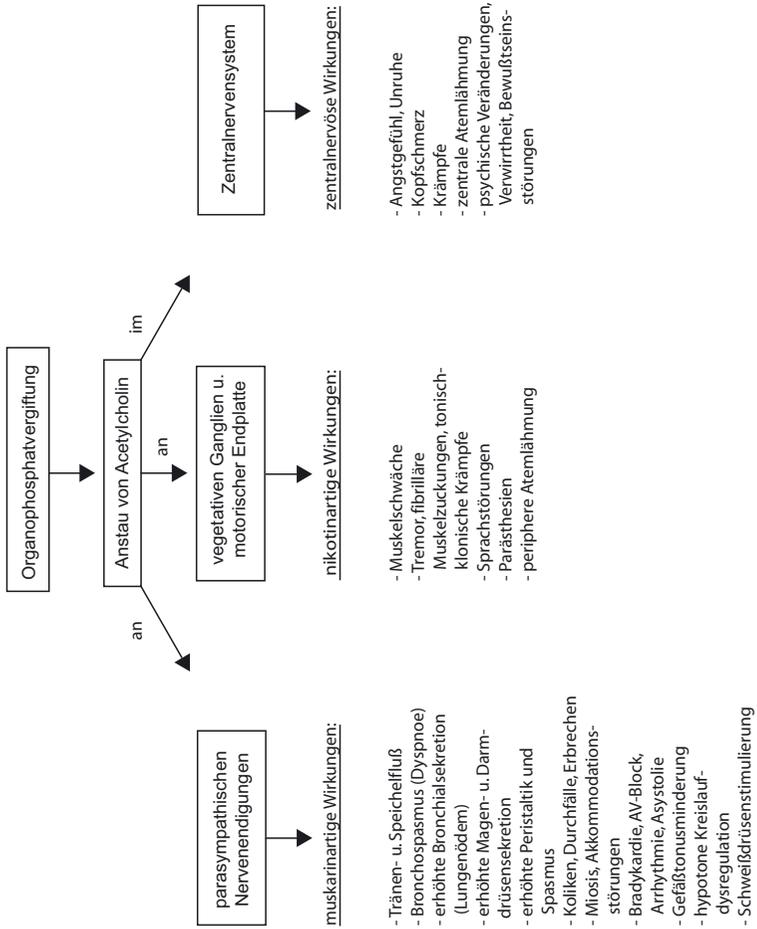


Abb. 4: Symptome der Organophosphatvergiftung

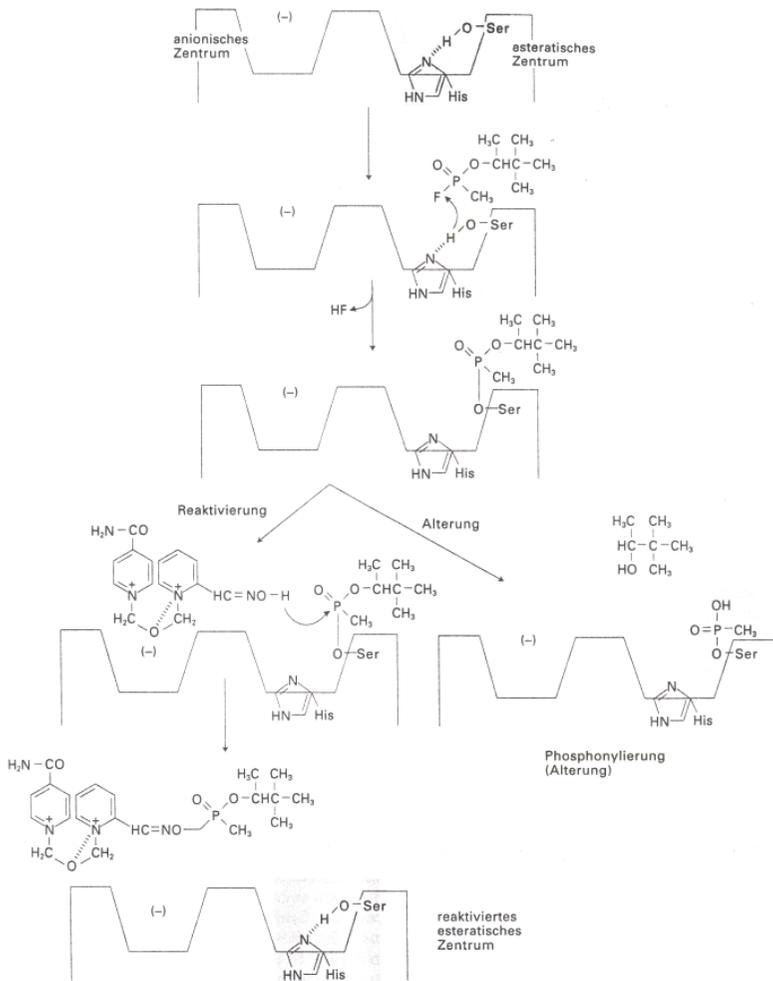


Abb. 5: Hemmung der AChE durch Soman, Alterung des Soman-AChE-Komplexes und Reaktivierung durch HI 6 (aus „Lehrbuch der Toxikologie“, Marquardt, H. und Schäfer, S.G., 1995)

Die Wirkung der die Cholinesterase blockierenden Nervenkampfstoffe läßt sich im menschlichen Organismus auf verschiedenen Wegen verringern oder beseitigen.

Optimale Antidot-Therapie ist notwendig für Verwundete in einem kontaminierten Gebiet, wo die Notwendigkeit, persönliche Schutzbekleidung zu tragen, eine künstliche Beatmung unmöglich macht. Zur Behandlung sind mehrere Antidote erforderlich.

Auswirkungen der Acetylcholinanhäufung in muskarinischen Synapsen können mit dem Anticholinergikum Atropin, durch Verdrängung des Acetylcholins vom muskarinischen Rezeptor, behandelt werden. Funktionsstörungen der quergestreiften Muskulatur werden durch Atropin in verträglichen Dosen nicht beeinflusst, hierfür werden Oxime eingesetzt.

Eine Erhöhung der eher kausal ausgerichteten therapeutischen Wirkung (Bethe, 1957) kann mit Reaktivatoren der AChE, den Oximen, erreicht werden. Bleibt eine schnelle Reaktivierung aus, so kommt es durch die sog. „Alterung“ des Enzyms (Ausbildung einer biologisch irreversiblen kovalenten Bindung zwischen dem Phosphoratom des Inhibitors und der esteratischen Stelle der Cholinesterase) zur irreversiblen Hemmung. Der Soman-AChE-Komplex in Abb. 5 „altert“ rasch in menschlichen Geweben mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Minuten und verliert dabei eine Alkylgruppe (rechte Seite der Abb. 5). Die Phosphonylierung wird somit irreversibel und die gehemmte AChE kann auch durch Oxime nicht mehr reaktiviert werden.

Eine Reaktivierung der Enzymfunktion stellt somit das entscheidende Prinzip der Therapie einer derartigen Vergiftung dar. Die Oxime der ersten Generation, Pralidoxim und Obidoxim, sind bei Vergiftungen mit VX und Sarin wirksam. Da diese Oxime bei der Somanvergiftung weitgehend unwirksam sind, wurde nach neuen Reaktivatoren gesucht. Deshalb versuchte, neben anderen Gruppen, der Arbeitskreis von Frau Professor Hagedorn in Freiburg seit den 60er Jahren Oxime zu synthetisieren, die auch eine verbesserte Wirksamkeit bei einer Somanvergiftung aufweisen. Zwei Oxime zeichneten sich besonders aus:

HI 6 (1-[[[4-(aminocarbonyl)pyridinio]methoxy]methyl]-2-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium Dichlorid) und

HLö 7 (1-[[[4-(aminocarbonyl)pyridinio]methoxy]methyl]-2,4-bis[(hydroxyimino)methyl]pyridinium Dimethansulfonat).

H-Oxime sind asymmetrisch substituierte Bispyridiniumsalze, die durch den nukleophilen Sauerstoff von eine oder zwei Aldoximgruppen das Phosphoratom des an das Enzym gebundenen Organophosphats angreifen. Durch die Abspaltung des Organophosphats vom katalytischen Zentrum wird die Aktivität der AChE wiederhergestellt. In Abb. 5 reagiert HI 6 mit Soman und bildet ein Phosphonyloxim unter Abspaltung (Reaktivierung) des Phosphonylrestes von der AChE (linke Seite der Abb. 5).

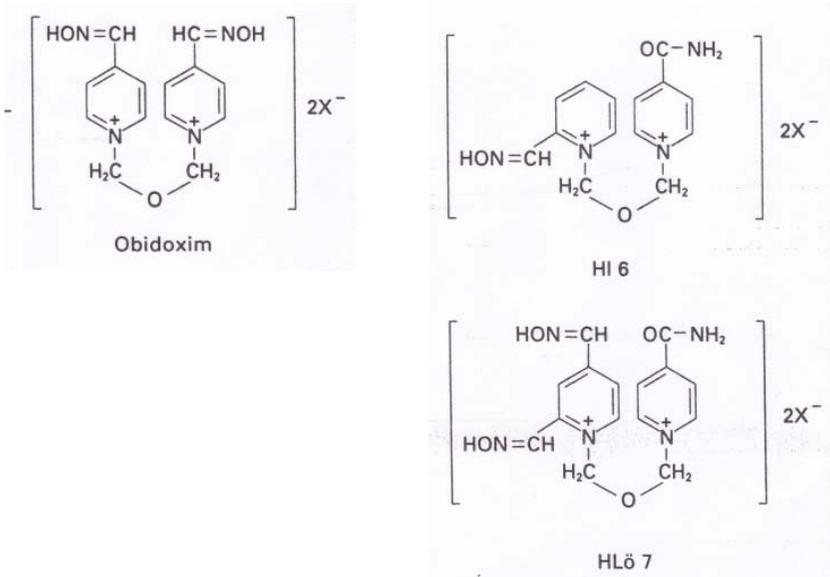


Abb. 6: Strukturformel von Obidoxim, HI 6 und HLö 7

Bei klinischer und experimenteller Organophosphatvergiftung wurden neben anderen Symptomen auch Herzrhythmusstörungen und Kreislaufdepression beobachtet (Ballantyne 1992).

Neben ausgeprägten Bradycardien traten bei Patienten und Versuchstieren auch tachycarde Rhythmusstörungen (Torsade de Pointes, Kammerflimmern) und eine Abnahme der Kontraktilität auf (Baskin 1992).

Sowohl in unvergifteten als auch in organophosphatvergifteten Tieren führte die Gabe von Oximen und Atropin ebenfalls zu Blutdruckabfall (Lundy 1979, Klimmek 1986, Worek 1993, 1994a, 1994b, 1995a). Als Ursache dafür wurde eine Ganglionblockade diskutiert (Lundy 1979). Worek (1995 b) beobachtete unmittelbar nach der Gabe von Atropin und HI 6 oder HLö 7 bei Nervenkampfstoff-vergifteten Meerschweinchen massive tachycarde Rhythmusstörungen, die in einem kausalen Zusammenhang mit der Therapie zu sein schie- nen. Eine mögliche direkte kardiale Wirkung vor allem der neueren Oxime HI 6 und HLö 7 ist bisher nur unzureichend charakterisiert. Über direkte Wechselwirkung zwischen Organo- phosphaten und Antidoten am Herzen gibt es auch nur geringe Informationen.

Neben der Frage der Reaktivierbarkeit der Oxime bei Nervenkampfstoffvergiftungen ist auch die Untersuchung der Eigenwirkung der verschiedenen Oxime und Atropin von klini- scher Bedeutung. Zur weiteren Aufklärung dieser Fragestellung wurden in einer großen Ver- suchsreihe am Modell des isolierten Meerschweinchenherzens nach Langendorff (1895) die Eigenwirkungen der einzelnen Antidote und Organophosphate getestet. Hierbei sind zum Einen die Auswirkungen auf Sinus- und Ventrikelfrequenz, zum Anderen das Druckverhal- ten des linken Ventrikels von Interesse.

Bei allen Versuchsreihen wurden die Aspekte der Reizleitung und Reizbildung im Meer- schweinchenherz geprüft. In weiteren Versuchen wurden die Wechselwirkung zwischen Atropin und den Oximen beobachtet. Ebenfalls wurde die Wirkung von Atropin, Obidoxim und HLö7 nach einer Exposition mit Soman ermittelt.

Ergänzend wurde in-vitro untersucht, ob HLö 7 oder HI 6 den Gehalt von energiereichen Phosphaten (ATP) oder von second-messenger Systemen (cAMP) beeinflussen.

Desweiteren bestimmten wir die HLö 7- Konzentration im Effluat, um zu prüfen, ob ein Abbau des Oxims während der Versuchsdurchführung stattfindet.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Substanzen

1.1. Allgemein verwendete Substanzen

Atropinsulfat Hydrat: SIGMA

Obidoxim Dichlorid: MERCK

HI 6 Dichlorid Monohydrat: DR. CLEMENT

HLö 7 Dimethansulfonat: J. BRAXMEIER

Soman, Sarin , Tabun, VX: Reinheitsgrad >90% durch GC- Bestimmung

DFP, Paraoxon, SIGMA

Malaoxon, DR. EHRENSTORFER

Carbogen, O₂ 95%, CO₂ 5%: LINDE

Stickstoff, tiefkalt verflüssigt: LINDE

Ingold Standard Pufferlösungen pH 7,00 und pH 4,00 (Eichpuffer für pH-Elektroden):
BACHOFER

Ingold 3M KCl-Lösung gesättigt mit AgCl (Elektrolyt für pH-Elektroden): BACHOFER

Natriumchlorid Lösung, isotonisch, NaCl 9,0g (Na⁺=154mval/l Cl⁻=154mval/l),
pH 5,00-7,00: SANITÄTSAMT DER BUNDESWEHR

1.2. Substanzen zur Herstellung der Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRB)

Kaliumchlorid (KCl): SIGMA

Natriumchlorid (NaCl): SIGMA

Kalziumchloriddihydrat (CaCl₂ · 2 H₂O): SIGMA

Natriumbicarbonat (NaHCO₃): SIGMA

Magnesiumsulfat zur Analyse (MgSO₄ · 7H₂O): MERCK

Kaliumhydrogenphosphat zur Analyse ISO (KH₂PO₄): MERCK

D(+)-Glucose-Monohydrat für biochemische und mikrobiologische Zwecke: MERCK

Benztraubensäure Natriumsalz für biochemische Zwecke: MERCK

1.3. Substanzen für die HPLC zur ATP- und cAMP-Messung

HPLC

Mobile Phase 59% H₂O, 40% Methanol, 1% PIC B-7,2 ml PIC-A

PIC B-7 Reagent (1-Heptane Sulfonic Acid): WATERS

PIC A Reagent (Tetrabutylammonium Phosphate): WATERS

H₂O und Methanol HPLC-grade: FISONS

c-AMP-Messung

Hank`s balanced salt solution (pro g Herz 10 ml)

KCl 0,4 g/l, KH₂PO₄ 0,06 g/l, NaCl 8,0 g/l, NaHCO₃ 0,35 g/l, Na₂HPO₄ 0,048 g/l,

D-Glucose 1,0 g/l, EDTA 1,86 g/l: SIGMA

Salzsäure HCl 0,1 M: MERCK

cAMP, Enzymimmunoassay(EIA)system (dual range), life science Test Kit: AMERSHAM

ATP-Messung

Perchlorsäure 70-72% (HClO₄): MERCK

Kaliumcarbonat (K₂CO₃): SIGMA

Kaliumhydroxid (KOH): SIGMA

ATP, β -Nicotinamide Adenine dinucleotide reduced form: SIGMA

Test Kit: 800 U/ml / 3PGK 450 U/ml

GAPD/PGK Enzyme mixture

PGA buffered solution

3-Phosphoglyceric acid 18 mmol/l mit buffer, Magnesium und EDTA, SIGMA

2. Geräte

2.1. Langendorff-Apparatur mit Messeinheit

Zur Herstellung der Lösungen wurden verwendet:

- Magnetrührer IKAMAG ® RH: JANKE & KUNKEL
- pH-Meter: Knick-Digital pH-Meter: BACHOFER
- pH-Elektrode: Ingold-pH-Elektrode (U-402-M6-S7) mit Halbmikro-pH-Einstabmeßkette: BACHOFER

Aus folgenden Geräten bestand die komplette Langendorff-Apparatur:

- Rollenpumpe Gilson Miniplus 2 mit einem Transformator: ABIMED
- Präzisionspumpe Gynkotek Model 480: GYNKOTEK
- Mikroinjektionspumpe für Glasspritzen CMA/100: BRAUN
- Wasserbad mit Thermostat und Umwälzpumpe, Thermostat 2761: EPPENDORF
- Statham Druckwandler (Typ P 23 3D, P 23 Db): GOULD

Ein Hellige-Messschrank diente als Mess- und Registriereinheit:

- Monitor (Memoskop Hellige 235036)
- 6-Kanal-Schreiber (Hellige Registrierteil 218101)
- Recomed-EKG-Vorverstärker (Hellige 20606006)
- 2 Recomed-Druckverstärker (Hellige 2060632)

Die linksventrikuläre Druckamplitude wurde mit Hilfe eines an einer Ballonkanüle aus Stahl (Durchmesser 1,5 mm) befestigten Polyurethanballons (Größe 3: SACHS) gemessen.

2.2. HPLC-Aufbau

GynkoteK: Gradientenpumpe M480
Injektionsautomat Gina 160
UV-Detektor UVD 320 S

Injektionsventil Typ 7000: RHEODYNE

Trennsäule: Ultrasphere octyl 5 μ 2.0 mm x 15 cm: BECKMANN

Die Auswertung erfolgte mit einem MAGIX 486 DX 33 und dem Gynkosoft Chromatographie Datensystem 4.12 .

2.3. ATP- und cAMP-Messung

Zum Zerkleinern der Proben diente ein Potter S Homogenisator (BRAUN).

Für die ATP-Messung wurden folgende Geräte benötigt:

Photometer 1101 M Hg 365nm: EPPENDORF

Zentrifuge Minifuge T: HERAEUS

Die cAMP-Messung wurde durchgeführt mit:

Amprep (Trimethylaminopropyl SAX): AMERSHAM

Baker spe-10* Extraktionssystem: BAKER

SLT 340 ATTC Elisareader: SLT

Die Proben wurden lyophilisiert mit:

Vakuum Konzentrator Modell BA-VC 300 H: BACHOFER

Kühlfalle KF-2-60: BACHOFER

Membranpumpe MP 18: BACHOFER

2.4. Firmenregister

Abimed, Düsseldorf
Altromin, Lage
Amersham International, Braunschweig
Bachofer, Reutlingen
Baker, Großgerau
Beckmann Instruments, San Remo CA 94583, USA
Braun, Melsungen
Dr. Braxmeier, Döpshofen
Dr. Clement, Defence Research Establishment Suffield, Kanada
Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Eppendorf, Hamburg
Fisons Scientific Equipment, Loughborough, GB
Gould, Statham, USA
Gynkotek, Germering
Hellige, Freiburg im Brsg.
Heraeus, Osterode am Harz
Janke & Kunkel, Staufen i. Br.
Krohne, Duisburg
Linde, Höllriegelskreuth
Merck, Darmstadt
Rheodyne, Cotati, USA
Hugo Sachs Elektronik, March
Sanitätsamt der Bundeswehr, Bonn
Sigma, Deisenhofen
SLT, Crailsheim
Waters Millipore Corporation, Milford MA 01757, USA

3. Methoden

3.1. Das isolierte perfundierte Meerschweinchenherz nach Langendorff

3.1.1 Herstellung des Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffers

In Anlehnung an die Dissertation von Lippstreu (1993) wurde die Pufferzusammensetzung übernommen.

0,6 M Stammlösungen von Magnesiumsulfat $MgSO_4$ und Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 und eine 2,35 M Stammlösung von Kaliumchlorid KCl wurden hergestellt. Natriumchlorid $NaCl$, Calciumchlorid $CaCl_2$, Natriumbicarbonat $NaHCO_3$, Glukose und Benztraubensäure-(Mono)-Natriumsalz (Pyruvat-Na) wurden direkt eingewogen und unter Begasung mit Carbogen bei mittlerer Rührgeschwindigkeit und Raumtemperatur gelöst.

In der entstandenen Lösung lagen folgende Endkonzentrationen der Stoffe vor:

KCl	4,7 mM
$MgSO_4$	1,2 mM
KH_2PO_4	1,2 mM
$NaCl$	118 mM
$CaCl_2$	2,5 mM
$NaHCO_3$	25 mM
Glucose	10 mM
Pyruvat	2,0 mM

Nach der Lösung aller Substanzen lag in dem Puffer unter Begasung ($37^\circ C$) mit Carbogen ein pH von 7,4 vor. Anschließend wurde der Puffer noch durch einen Faltenfilter filtriert.

Zur Lösung der einzelnen Antidote oder Organophosphate wurde eine 0,9% ige $NaCl$ -Lösung (154 mmol/l) verwendet.

3.1.2. Präparation der Meerschweinchen

Weibliche Pirbright-white Meerschweinchen (Lippische Versuchstierzucht, Fa. Hagemann, Extertal) wurden zu zweit in oben offenen Boxen bei 24° C, 55% Luftfeuchtigkeit und einem 12 stündlichen Tag- und Nachtrhythmus gehalten und wurden vor Versuchsbeginn zwei Wochen adaptiert. Sie waren 2-3 Monate alt und wogen zwischen 250g und 300g. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Altromin Haltungsfutter, Fa. Altromin).

Die Meerschweinchen wurden zunächst mit Diäthyläther narkotisiert, durch Genickbruch getötet und dann auf einem Operationstisch fixiert.

Anschließend wurde das Fell vom Processus Xiphoideus bis zum Hals durch einen medianen Längsschnitt durchtrennt und zur Seite wegpräpariert. Danach wurde der Thorax vom Zwerchfell aus rechts und links entlang dem Rippenbogen aufgeschnitten. Durch zwei weitere axilläre Längsschnitte durch die Rippenbögen wurde das Herz freigelegt und sofort mit Eis und eiskalter Kochsalzlösung gekühlt.

Die Kühlung erfolgte während der gesamten Präparationsdauer.

Das Perikard wurde von der Herzspitze aus bis zum cranialen Gefäßstiel eröffnet und entfernt. Der Gefäßstiel wurde bestmöglich von umgebendem Fett und Bindegewebe befreit. Nun wurden die V. cava inferior und V. cava superior abgebunden und um den aufsteigenden Teil der Aorta (A. ascendens) ein Faden gelegt. Nach Durchtrennung der Aorta ascendens wurde die Aortenkanüle nicht zu tief in der Aorta fixiert, um eine Verlegung der Koronarostien zu vermeiden. Der groben Entfernung der Lungen folgte die Entnahme des Herzens und der sofortige Anschluß an die Langendorff-Apparatur zur Perfusion mit KRB-Puffer. Vor dem Anschluß wurden eventuell gebildete Blutkoagel mit einer NaCl-gefüllten Spritze aus der Aortenkanüle entfernt. Schon wenige Sekunden nach Perfusionsbeginn begann das Herz wieder zu schlagen und wurde durch das Ausspülen des Blutes blaßrosa.

Die Zeit vom Tod des Meerschweinchens bis zur Perfusion des Herzens konnte auf 2 Minuten optimiert werden. Dadurch wurden eventuelle Herzschädigungen durch Hypoxie minimiert.

Um den Abfluß der Perfusionslösung gewährleisten zu können, wurde die A. pulmonalis durch einen kleinen Schnitt eröffnet und ein Katheter eingebunden.

Über einen Einschnitt am Ansatz des linken Herzohres wurde eine Ballonkanüle in den linken Ventrikel eingeführt.

Zuletzt wurden noch zwei mit NaCl getränkte Wollfäden (der eine an der Herzspitze, der andere in der Nähe des rechten Vorhofs) befestigt.

3.1.3. Versuchsaufbau

Das Herz schlug trotz Isolation von ZNS, Vegetativum und Blutkreislauf durch die autonomen Erregungsbildungszentren bei Perfusion mit Nährstoffen, Salzen und Sauerstoff weiter.

Die Perfusion erfolgte retrograd über die Aorta ascendens und die Ostien in das Koronarsystem mit der Pufferlösung. Dabei verhinderte die Aortenklappe ein Eintreten der Lösung von retrograd in den linken Ventrikel. Die A. pulmonalis erreichte das Perfusat über den Sinus coronarius, rechten Vorhof und rechten Ventrikel und konnte von dort abgeleitet werden.

In Abbildung Nr. 7 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt:

Eine Vorratsflasche (1) mit KRB-Nährlösung wurde im Wasserbad (2) auf 37° C erwärmt, um der Blasenentwicklung in den Schläuchen entgegenzuwirken. Durch eine Rollenpumpe (3) mit 2 Schläuchen wurde der KRB-Puffer aus der Vorratsflasche durch einen Oxygenator (4) gepumpt und dort mit Carbogen (5) begast. Eine zweite Rollenpumpe (6) mit 4 Schläuchen leitete nun die sauerstoffreiche Lösung aus dem Oxygenator zum Herzen (7). Unmittelbar vor dem Eintritt in das Herz wurde das Perfusat im Wasserbad (8) über Glasspiralen nochmals auf 37° C erwärmt.

Die Entstehung von Luftblasen wurde durch die schon erwähnte Erwärmung der Vorratsflasche vermindert. Luftblasen, die sich dennoch im System angesammelt hatten, konnten an einem T-Stück (9) hinter dem Oxygenator oder durch den Blasenfänger (10) im Wasserbad entweichen.

Für die bipolare EKG-Ableitung wurden im Bereich der abgebundenen Vena cava superior und an der Herzspitze Wollfäden angebracht (13).

Die linksventrikuläre Druckamplitude (LV) wurde mit einer alkoholgefüllten, intraventrikulären Ballonkanüle zur isovolumetrischen Druckmessung gegen den Atmosphärendruck aufgenommen.

Ein Polyurethanballon (Größe 3) wurde an einer Stahlkanüle (Durchmesser 1,5mm) (Sachs) befestigt. Die Kanüle wurde spannungs- und luftblasenfrei mit 20% igem Ethanol in demineralisiertem Wasser gefüllt und an einen Druckwandler (11) angeschlossen. Der Nullabgleich erfolgte über einen Dreiwegehahn gegen den Atmosphärendruck. Anschließend wurde der Ballon im linken Ventrikel plaziert.

Die EKG- und Drucksignale wurden als Eingangssignale über frontseitige Leitungen in die jeweiligen Vorverstärker des Messschrankes eingespeist.

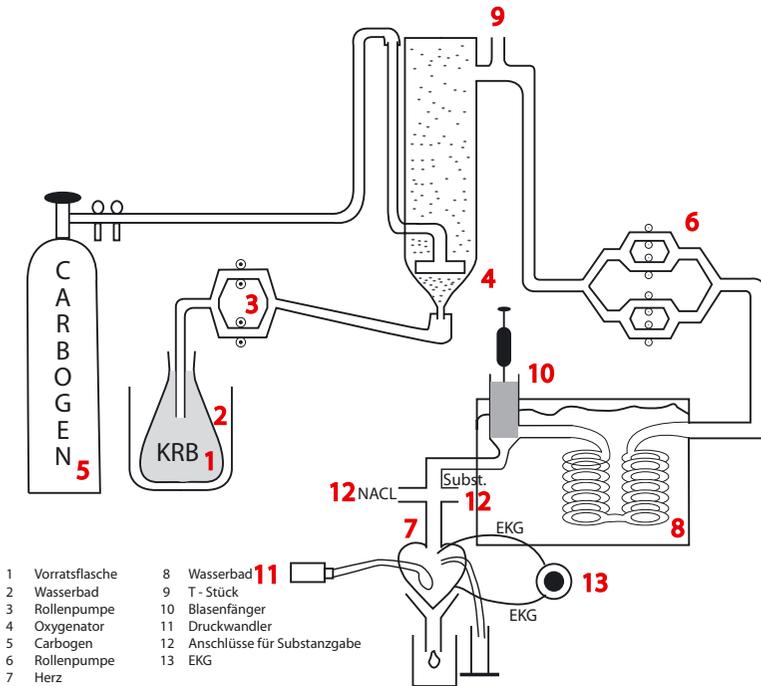


Abb. 7: Versuchsaufbau

3.1.4. Versuchsdurchführung

Die Herzen wurden volumenkonstant mit 10 ml/min perfundiert. Davon waren 9 ml/min begaster KRB-Puffer und 1 ml/min unbegaste Substanzlösung. Nach dieser Verdünnung lagen die in der KRB-Lösung enthaltenen Stoffe bei der Passage der Koronarien in folgenden Endkonzentrationen vor: Na^+ 129 mmol/l, K^+ 5,3 mmol/l, Ca^{2+} 2,25 mmol/l, Mg^{2+} 1,1 mmol/l, Cl^- 115 mmol/l, HCO_3^- 22,5 mmol/l, SO_4^{2-} 1,1 mmol/l, H_2PO_4^- 1,1 mmol/l, Glucose 9,0 mmol/l, Pyruvat 1,8 mmol/l. Nach beendeter Präparation wurden die Herzen 30 Minuten mit 9 ml/min begaster KRB-Lösung und 1 ml/min NaCl-Lösung perfundiert, bis sie sich auf die extrakorporalen Bedingungen umgestellt hatten und rhythmisch, frequent und konstant schlugen. Die einheitliche Äquilibrierungszeit von 30 Minuten wurde bei jedem Versuch beibehalten. Nach dieser Adaptierungsphase wurden die Ausgangswerte bestimmt.

Anschließend wurden die Substanzen als Dauerinfusionen über Perfusionspumpen die entsprechende Einwirkzeit lang verabreicht. Die genaue Abfolge der Substanzgabe kann den folgenden Flussdiagrammen (Abb. 8 bis Abb. 12) entnommen werden. Am Ende der Versuche schloss sich jeweils eine Auswaschphase von 20 Minuten an.

Zur Erstellung kumulativer Dosis-Wirkungs (DW)-Kurven wurden die Substanzen in aufsteigenden Konzentrationen perfundiert. Die jeweils nächsthöhere Dosis wurde ohne Auswaschen unmittelbar nach der vorhergehenden Dosis verabreicht. Bei Einzeldosierungen wurde jede Dosis an einem neuen Herzen perfundiert.

Die Messwerte wurden bei einem Papiervorschub von 5 mm/min und 25 mm/min registriert. Messparameter waren: Sinusfrequenz (SF), Ventrikelfrequenz (VF) und linksventrikuläre Druckamplitude (LV). SF wurde durch Auszählung der P-Wellen im EKG (Papiervorschub 25 mm/min) und VF aus den Ventrikelkontraktionen bestimmt. LV wurde aus den registrierten Kurven ermittelt.

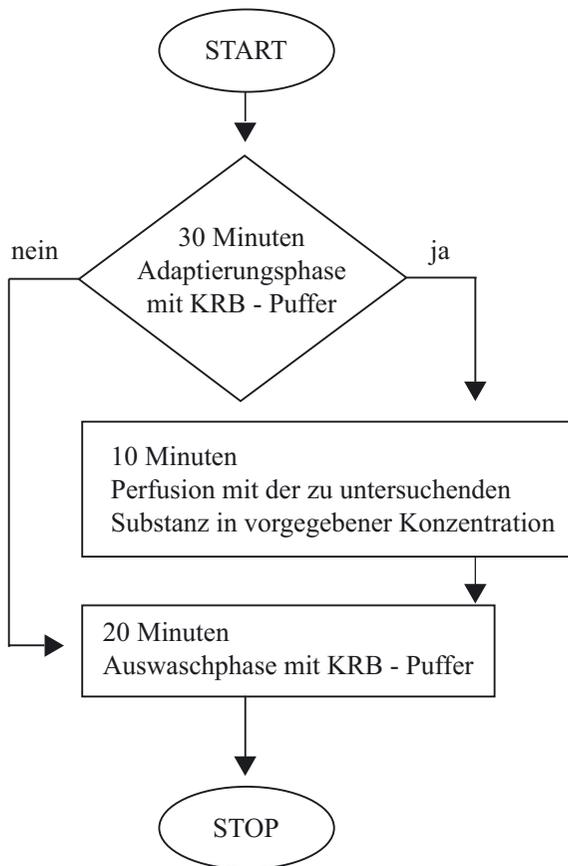


Abb. 8: Flussdiagramm zur Versuchsdurchführung der Eigenwirkung der Substanzen für Einzelversuche (III. 1.) Versuchsdauer 60 min.

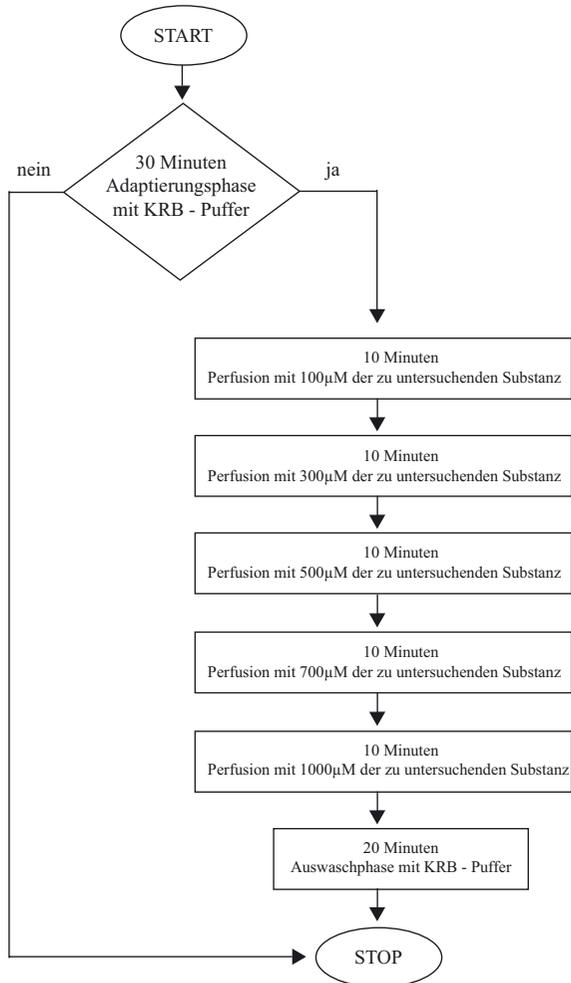


Abb. 9: Flussdiagramm zur Versuchsdurchführung der Eigenwirkung der Substanzen für Kumulativversuche (III.1.), Versuchsdauer 100 Minuten

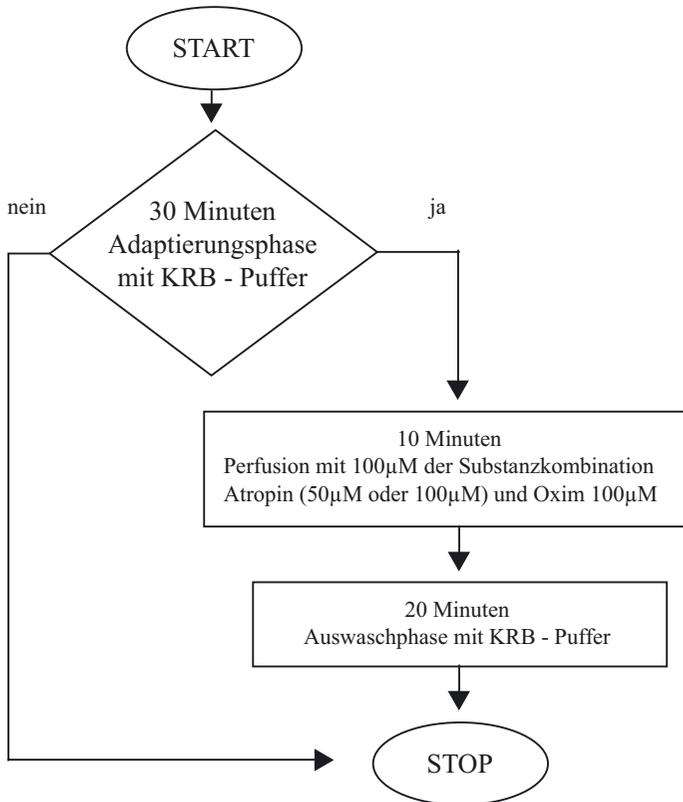


Abb. 10: Flussdiagramm zur Versuchsdurchführung der Wechselwirkung von Atropin mit den Bispyridiniumoximen (III.2.), Versuchsdauer 60 Minuten

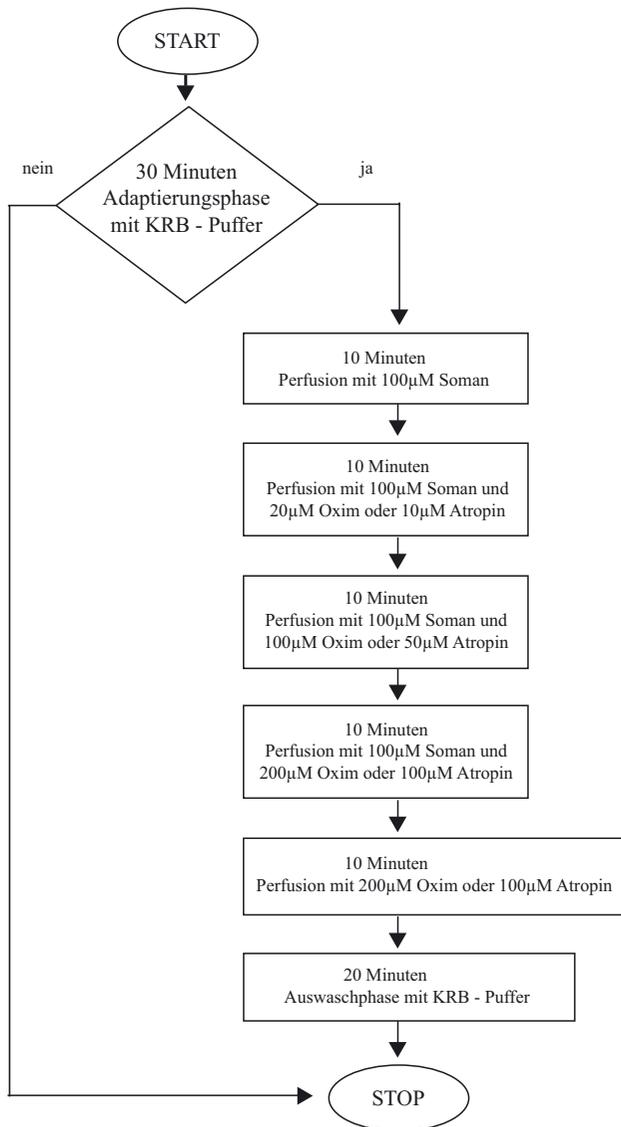


Abb. 11: Flussdiagramm zur Versuchsdurchführung der Wirkung der Antidote in Gegenwart von 100 µM Soman (III.3.), Versuchsdauer 100 Minuten

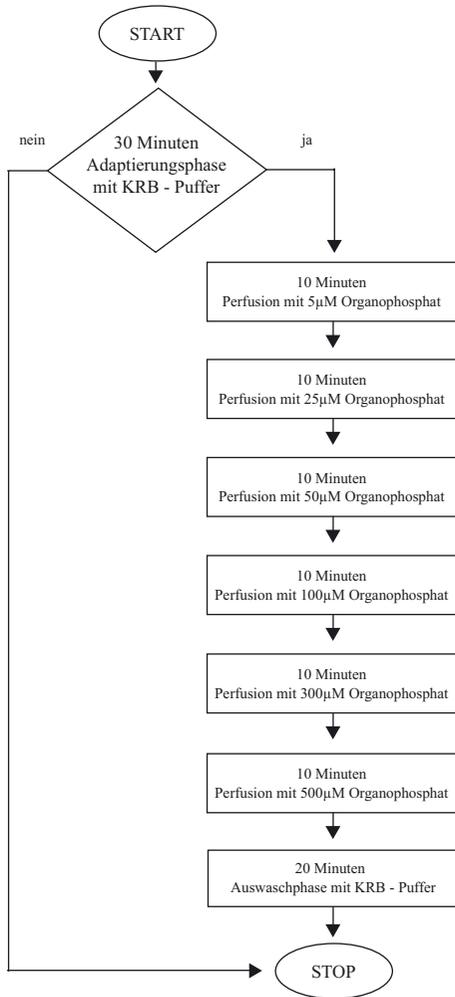


Abb. 12: Flussdiagramm zur Versuchsdurchführung der direkten Wirkung verschiedener Organophosphate und Carbamate (III.4.), Versuchsdauer 100 Minuten

3.2. ATP- und cAMP-Messung

Für die Bestimmung des ATP- und cAMP-Gehaltes wurden HI 6 oder HLö 7 (50, 300 oder 1000 μM) für jeweils 30 Minuten perfundiert. Sofort im Anschluß wurde das Herz mit einer modifizierten Wollenbergerzange in flüssigem Stickstoff schockgefroren, zerkleinert und pulverisiert.

ATP-Messung

Die Analyse der ATP-Werte erfolgte mit einem enzymatischen UV-Test (Sigma).

Zu einem Teil Gewebe (g) wurden zwei Teile Perchlorsäure 6% in ein 5 ml Potterglas gegeben, um es anschließend im Kühlschrank auftauen zu lassen. Unter Kühlung wurde es dann 3 mal 10 s gepottert. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 2° C, 3000 rpm kam zum Überstand K_2CO_3 3,75 mol/l bzw. KOH 2,0 mol/l hinzu. Anschließend wurde eine weitere Minute zentrifugiert.

Zu dem 0,5 ml Überstand kamen 0,3 ml NADH Phiolen (Vial), 1 ml (3-Phosphoglycerinsäure) PGA Pufferlösung und 1,5 ml Wasser hinzu. Alle Substanzen wurden gemischt und bei 365 nm Photometer gemessen (= Absorption A1). Nach Zugabe von 0,04 ml GAPD/PGK Enzym Mixtur erfolgte eine erneute Messung (= Absorption A2). Zu dem endgültigen ATP-Wert kam man mit folgenden Gleichung:

$$\Delta A = A1 - A2$$

$$\text{ATP } (\mu\text{M/dl}) = \Delta A \times 195$$

cAMP-Messung

Die cAMP-Konzentrationen wurden mittels Enzymimmunoassay (Amersham) ermittelt.

Pro Gramm Herz wurden 10 ml Hank's Lösung gegeben. In Eis stehend wurde es anschließend 3 mal 20 Sekunden gepottert und bei 4° C, 1000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde noch einmal mit Hank's Puffer 1:10 verdünnt und davon 1 ml auf die Amprep Säule gegeben (Vorher wurden die Säulen zweimal mit je 1 ml Methanol und 1 ml H_2O konditioniert.). Dann folgte das Auswaschen mit 3 ml Methanol. Anschließend wurde mit 3 ml 0,1 M HCl eluiert und dann wurde die Probe gefriergetrocknet, um eine Alterung von cAMP zu minimieren. Gemäß der Anleitung von Biotrak (Amersham) wurden die Extrakte bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spectrophotometer gemessen.

3.3. HLö 7- Messung in Perfusatproben

Für die quantitative Bestimmung der HLö 7 Konzentration im Perfusat wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben im Effluat genommen und mit der HPLC-Methode von Eyer (1992) gemessen (Flussrate 1,2 ml/min., Wellenlänge 298 nm).

Der Eluent wurde bei einem Flow von 0,5 ml/min durch die HPLC-Anlage gepumpt.

Das unmittelbar nach den Versuchen eingefrorene Perfusat wurde in 50% PIC-B7 und 50% H₂O 1:50 verdünnt. Davon wurden 20 µl auf die Säule injiziert.

Zur Standardmessung dienten 100 ng/20 µl HLö 7 als Vergleichswert.

3.4. Datenauswertung und Datendarstellung

Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte \pm Fehler des Mittelwertes (MW \pm SE) in Prozentwerten der Absolutwerte angegeben. Für jede einzelne Versuchsreihe wurden je 6 Meerschweinchenherzen untersucht (n=6).

Eine statistische Prüfung erfolgte mit dem Statistikprogramm CSS (Stat Soft, USA-Tulsa). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$) und innerhalb einer Versuchsgruppe mit dem Wilcoxon-Matched-pair Test ermittelt.

Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant unterschiedlich betrachtet (Sachs 1974).

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Dosis-Wirkungs-Kurven und Säulendiagramme verwendet.

III. ERGEBNISSE

1. Eigenwirkung von Atropin, Obidoxim, HI 6 und HLö 7 bei unterschiedlichen Konzentrationen

Nach einer Adaptierungsphase von 30 Minuten wurden die Ausgangswerte erhoben. Anschließend wurden die zu untersuchenden Substanzen in Einzel- oder Kumulativen Dosen für jeweils 10 Minuten zugegeben und am Ende jedes Dosierungsintervalls die Messwerte ermittelt. Am Ende des Versuchs schloss sich eine Auswaschphase an (Abb. 8 und Abb. 9).

1.1. Eigenwirkung von Atropin

Einzel-Versuche

Atropin hatte ab einer Dosis von 300 μM Einfluß auf die Herzfrequenz und Druckamplitude (Abb. 15). Einzeldosen ab 300 μM führten zu einer signifikanten Abnahme der Sinusfrequenz, Ventrikelfrequenz und der linksventrikulären Druckamplitude (Abb. 13). Ebenfalls traten bei 300 μM vereinzelt polytope ventrikuläre Extrasystolen auf. Ab einer Konzentration von 500 μM konnte man Sinusbradycardie, ventrikuläre Tachykardie und einen totalen AV-Block mit fehlender ventrikulärer Überleitung das erste mal beobachten. Diese Beobachtungen setzten sich in den folgenden höheren Dosierungen fort (Abb. 14). Extrasystolen mit elektromechanischer Entkoppelung kamen bei 1000 μM neu hinzu.

In der Auswaschphase erreichten SF und VF 103% des Ausgangswertes und die LV 77% des Ausgangswertes wieder.

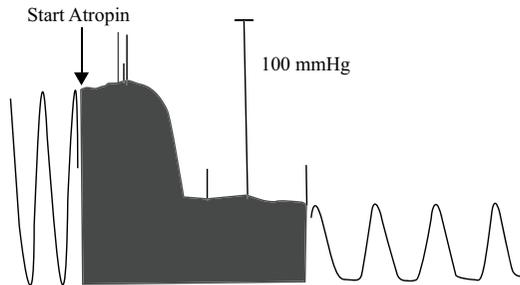
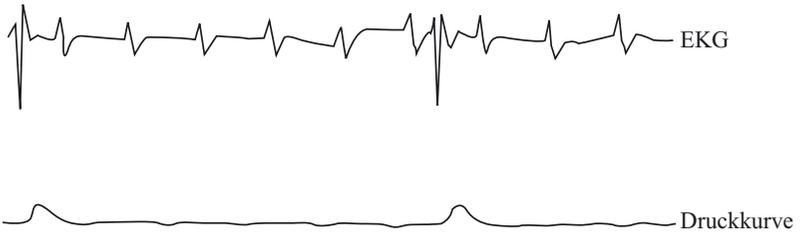


Abb. 13: Eigenwirkung von 300 μM Atropin. Die LV reagierte mit einem Amplitudenabfall um 60%. Repräsentativer Ausschnitt aus der Originalkurve eines Einzelversuchs.

a)



b)

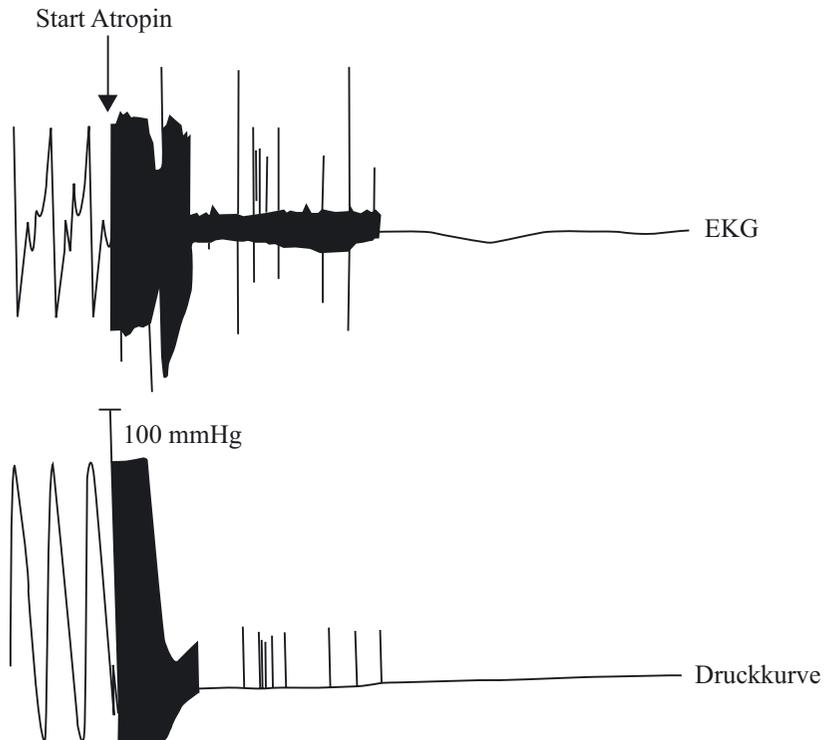


Abb. 14: Eigenwirkung von $1000 \mu\text{M}$ Atropin. Bei dieser Konzentration traten sowohl ein AV-Block III. Grades (a) als auch ein totaler AV-Block mit fehlender ventrikulärer Überleitung (b) auf. Ausschnitte aus den Originalkurven von 2 Einzelversuchen.

Kumulativ-Versuche

Sinusfrequenz, Ventrikelfrequenz und die linksventrikuläre Druckamplitude verhielten sich allgemein so wie bei der Einzeldosierung.

Ein signifikanter Unterschied zwischen einzelner und kumulativer Atropindosierung war bei 500 μM bei der VF zu sehen (Abb. 15). Weiterhin konnte man signifikante Unterschiede zu den Einzelversuchen bei allen drei Parametern mit einer Konzentration von 700 μM feststellen (Abb.15).

In der Auswaschphase erreichten SF und VF ca. 90 % des Ausgangswertes und die LV 50 % des Ausgangswertes.

Arrhythmien traten wie bei den Einzelversuchen ab 300 μM auf. Ersichtlich war der Beginn der Arrhythmien auch durch die divergierenden Werte von SF und VF.

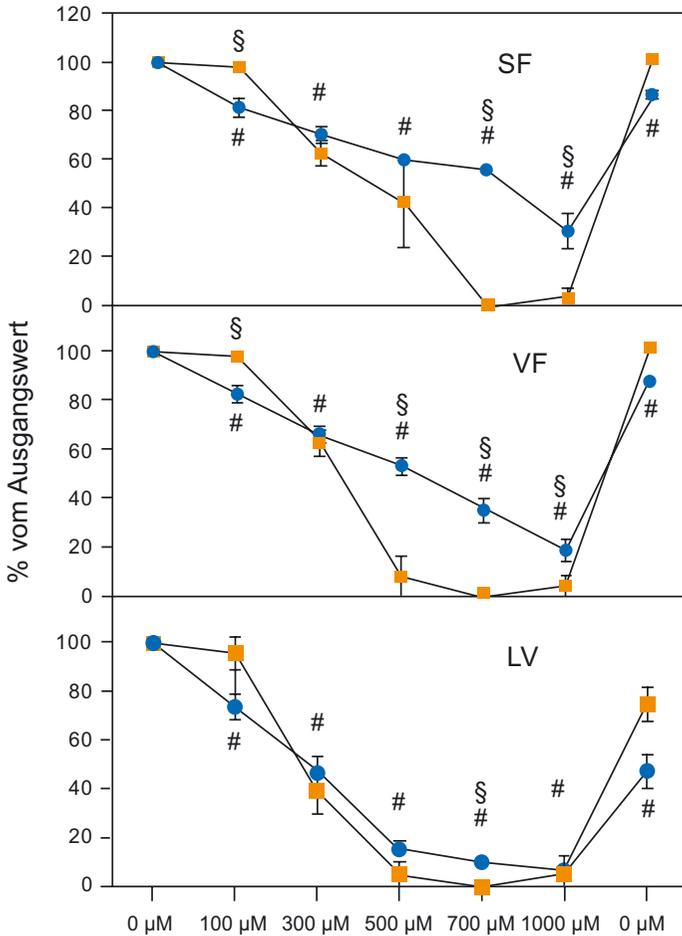


Abb. 15: Weibliche Meerschweinchen wurden narkotisiert, das Herz entnommen und nach Langendorff Art perfundiert. Atropin wurde entweder in Einzeldosierung (■) oder Kumulativdosierung (●) in Konzentrationen von 100 μM, 300 μM, 500 μM, 700 μM und 1000 μM für je 10 Minuten verabreicht, gefolgt von 20 Minuten Auswaschphase. Gemessen wurden jeweils Sinusfrequenz (SF), Ventrikel-frequenz (VF) und die linksventrikuläre Druckamplitude (LV). Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte ± Standardfehler in Prozent vom Ausgangswert dar. Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), ($n=6$). Die statistische Prüfung erfolgte mit: Mann-Whitney-U-Test (§: Vergleich einzel-kumulativ) und Wilcoxon matched pairs Test (: Vergleich der Kumulativwerte zum Ausgangswert).

1.2. Eigenwirkung von Obidoxim

In allen Konzentrationen von 100 μM bis 1000 μM zeigten SF und VF sowohl bei Einzel-, als auch bei Kumulativgabe keine signifikanten Schwankungen. Bei Einzelgabe von Obidoxim kam es zu keinen signifikanten Änderungen der LV (Abb. 16 und 17), während sich bei kumulativer Gabe die Druckamplitude auf ca. 80% des Ausgangswerts verminderte. In dieser Testreihe lag bei jeder Messung der LV ein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert vor. Im Vergleich der Einzel- und Kumulationsversuche stellten sich die Ergebnisse bei den Konzentrationen von 100 μM bis 1000 μM mit signifikanten Abweichungen dar (Abb. 17). Vereinzelt traten bei 100 μM und 500 μM Extrasystolen auf.

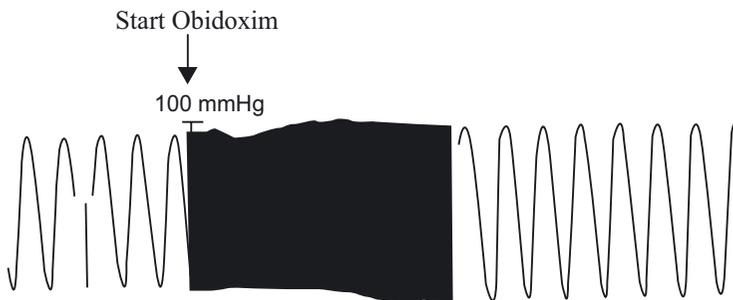


Abb. 16: Eigenwirkung von 1000 μM Obidoxim. In diesem Auszug aus der Originalkurve reagierte die linksventrikuläre Druckamplitude (LV) auf Perfusion mit 1000 μM Obidoxim mit einem Amplitudenanstieg.

1.3. Eigenwirkung von HI 6

HI 6 in einer Konzentration von 100 bis 1000 μM hatte keinen Einfluß auf die Herzfrequenz (Abb. 18). Einzeldosen führten zu einer leichten Zunahme der Druckamplitude, während sich diese bei kumulativer Gabe auf ca. 80 % reduzierte.

Bei der linksventrikulären Druckamplitude fand man sowohl bei allen kumulativen Konzentrationsgaben einen signifikanten Unterschied zum Ausgangswert, als auch im Vergleich der Einzel- und Kumulationsversuche.

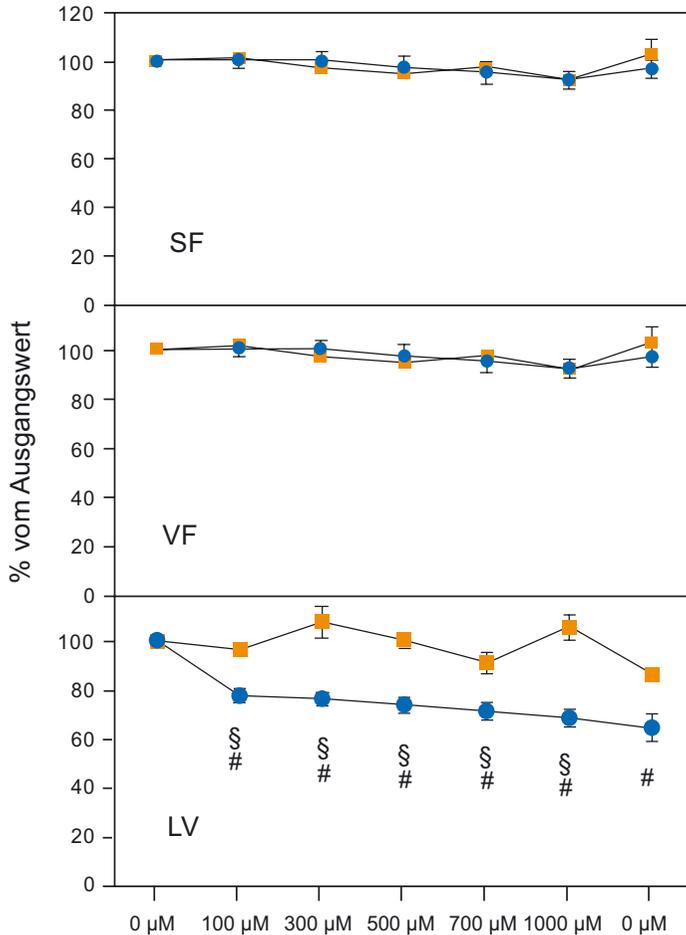


Abb. 17: Wirkung von Obidoxim auf Sinusfrequenz (SF) Ventrikelfrequenz (VF) und linksventrikuläre Druckamplitude (LV) bei Einzel- (■) und Kumulativdosierung (●) in Konzentrationen von 100 μM, 300 μM, 500 μM, 700 μM und 1000 μM.

Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), $n=6$.

§ = Mann Whitney U-Test (Vergleich einzel-kumulativ)

= Wilcoxon matched pairs Test (Vergleich der Kumulativwerte zum Ausgangswert)

Einzelheiten siehe Legende zu Abb.15.

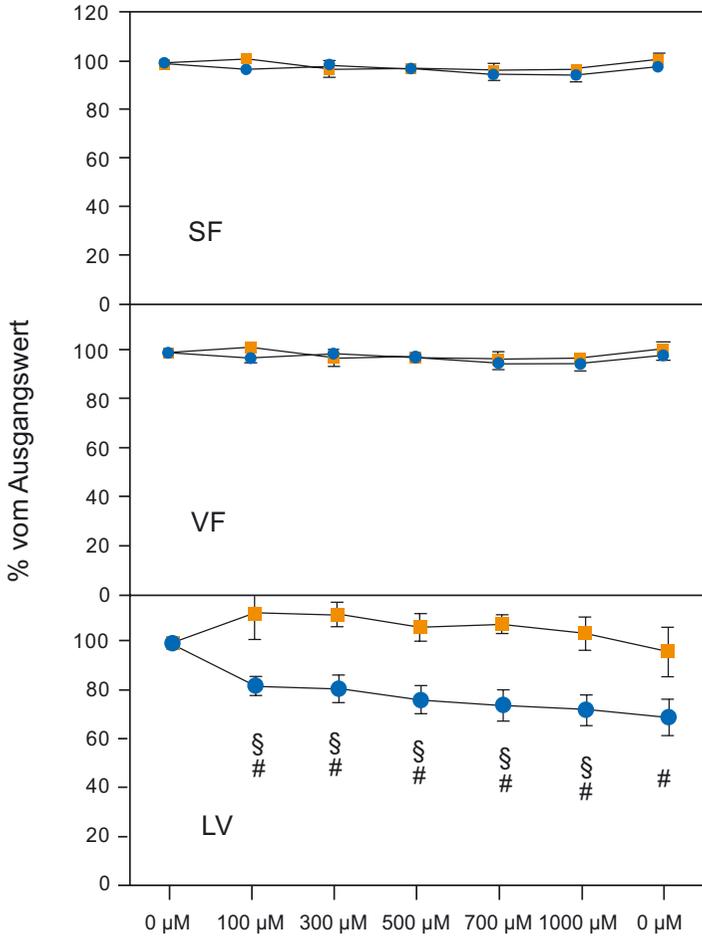


Abb. 18: Wirkung von HI 6 auf Sinusfrequenz (SF) Ventrikelfrequenz (VF) und linksventrikuläre Druckamplitude (LV) bei Einzel- (●) und Kumulativdosierung (■) in Konzentrationen von 100 µM, 300 µM, 500 µM, 700 µM und 1000 µM.
 Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), $n=6$.
 § = Mann Whitney U-Test (Vergleich einzel-kumulativ)
 # = Wilcoxon matched pairs Test (Vergleich der Kumulativwerte zum Ausgangswert)
 Einzelheiten siehe Legende zu Abb.15.

1.4. Eigenwirkung von HLö 7

Mit HLö 7 kam es zu einer signifikanten Abnahme der LV bei Einzel- (1000 μM , Abb. 19 und 22) und kumulativer Gabe (100 – 1000 μM , Abb. 22).

Bei allen Konzentrationen von 100 μM bis 1000 μM zeigten alle Ergebnisse der Einzelversuche signifikante Unterschiede zu den Werten der kumulativen Testreihe (Abb. 22).

Vereinzelt konnte man bei 100 μM Extrasystolen erkennen. Die Divergenz von SF und VF ab 500 μM gab in beiden Versuchsreihen Hinweise auf das Auftreten von Arrhythmien.

AV-Block II. und III. Grades, ventrikuläre Tachycardien und Sinusarrhythmien sah man schon bei 500 μM (Abb. 20). Mit der Konzentrationssteigerung auf 1000 μM trat nach vier Minuten Kammerflimmern auf. Bei dieser Dosierung kam es vermehrt zu einer gestörten ventrikulären Überleitung, deformierten QRS-Komplexen und AV-Blöcken (II. und III.) (EKG-Beispiel in Abb. 21).

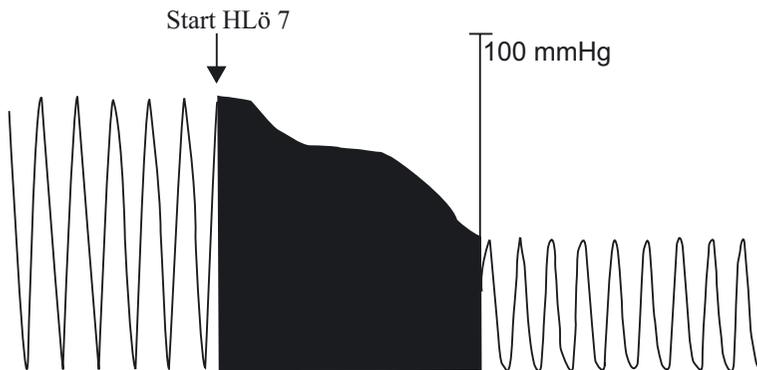
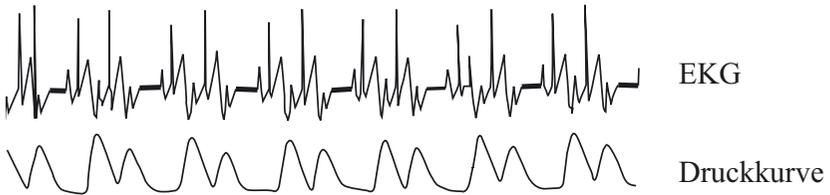


Abb. 19: Eigenwirkung von 1000 μM HLö 7. Signifikanter Amplitudenabfall der LV auf 42% vom Ausgangswert bei Perfusion des Langendorff-Herzens mit 1000 μM HLö 7. Repräsentativer Ausschnitt aus der Originalkurve eines Einzelversuchs.



Abb. 20: Eigenwirkung von 500 μM HL δ 7. Ab 500 μM HL δ 7 traten bei der kumulativen Versuchsreihe Extrasystolen auf. Dies stellt ein dafür relevantes Beispiel aus der Originalkurve eines Einzelversuchs dar.

a)



b)

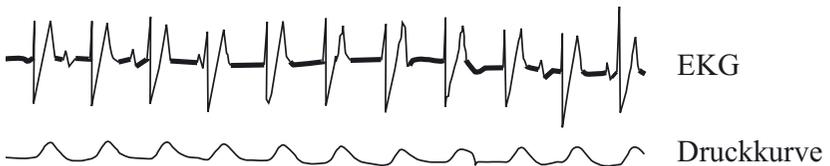


Abb. 21: Eigenwirkung von 700 μM und 1000 μM HL δ 7. Nach Behandlung der Meerschweinchenherzen mit 700 μM (a) und 1000 μM (b) HL δ 7 traten AV-Blöcke III. Grades auf. Hier zwei Ausschnitte aus den Originalkurven von 2 Einzelversuchen.

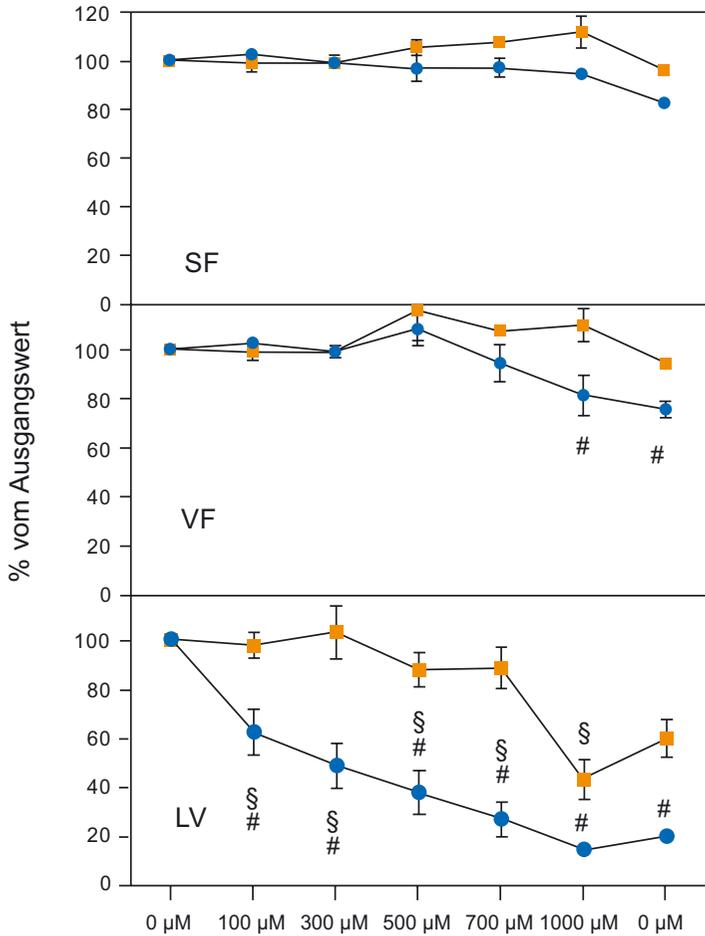


Abb. 22: Wirkung von HLö 7 auf Sinusfrequenz (SF) Ventrikelfrequenz (VF) und linksventrikuläre Druckamplitude (LV) bei Einzel- (■) und Kumulativdosierung (●) in Konzentrationen von 100 µM, 300 µM, 500 µM, 700 µM und 1000 µM.

Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), $n=6$.

§ = Mann Whitney U-Test (Vergleich einzel-kumulativ)

= Wilcoxon matched pairs Test (Vergleich der Kumulativwerte zum Ausgangswert)

Einzelheiten siehe Legende zu Abb.15.

1.5. Vergleich der Oxime Obidoxim, HI 6 und HLö 7

HI 6 und Obidoxim hatten in beiden Versuchsreihen keinen Einfluß auf die Herzfrequenz (Abb. 23 und 24). Bei beiden Oximen nahm die Druckamplitude bei kumulativer Gabe auf ca. 80 % ab (Abb. 24).

HLö 7 hatte ebenfalls keinen nennenswerten Einfluß hinsichtlich der Herzfrequenz.

Allerdings kam es im Vergleich zu den Oximen HI 6 und Obidoxim zu einer signifikanten Abnahme der linksventrikulären Druckamplitude bei kumulativer Gabe ab 300 μM (Abb. 24).

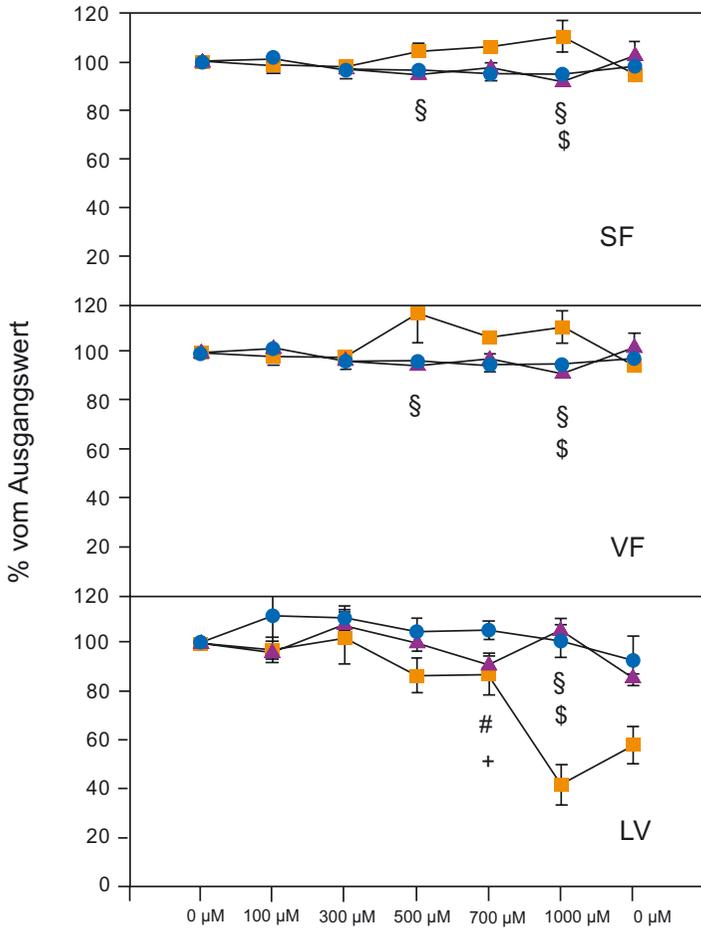


Abb. 23: Wirkung von Obidoxim (▲), HI 6 (●) und HLö 7 (■) auf Sinusfrequenz (SF), Ventrikelfrequenz (VF) und linksventrikuläre Druckamplitude bei Einzeldosierung in Konzentrationen von 100 µM, 300 µM, 500 µM, 700 µM und 1000 µM.
 Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), $n=6$.
 § = Mann Whitney U-Test : Obidoxim - HLö 7
 # = Mann Whitney U-Test : Obidoxim - HI 6
 \$ = Mann Whitney U-Test : HI 6 - HLö 7
 + = Mann Whitney U-Test : HI 6 - Obidoxim
 Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 15.

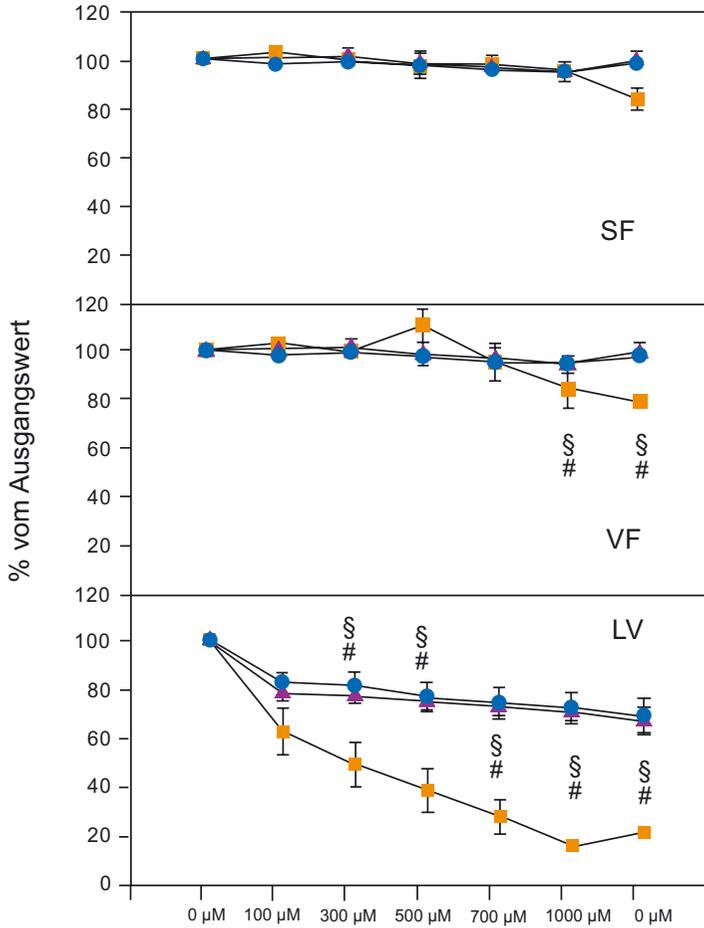


Abb. 24: Wirkung von Obidoxim (▲), HI 6 (●) und HLö 7 (■) auf Sinusfrequenz (SF), Ventrikelfrequenz (VF) und linksventrikuläre Druckamplitude bei Kumulativdosierung in Konzentrationen von 100 µM, 300 µM, 500 µM, 700 µM und 1000 µM.

Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), $n=6$.

§ = Mann Whitney U-Test : Obidoxim - HLö 7

= Mann Whitney U-Test : HI 6 - HLö 7

Einzelheiten siehe Legende zu Abb.15.

2. Wechselwirkung von Atropin mit den Bispyridiniumoximen

Nach einer Adaptierungsphase von 20 Minuten wurden die zu untersuchenden Substanzen, 50 oder 100 μM Atropin und 100 μM Oxim, für jeweils 10 Minuten zugegeben.

Am Ende des Versuchs schloss sich eine Auswaschphase an (Abb. 10).

2.1. Wirkung von Atropin in Kombination mit Obidoxim

Die Kombination von Obidoxim und Atropin hatte keinen Einfluß auf LV. Es zeigten sich lediglich bei der Sinusfrequenz und Ventrikelfrequenz signifikante Unterschiede zur Einzelgabe von 100 μM Obidoxim (Abb. 26).

In dieser Testreihe kam er zu keinen Arrhythmien.

2.2. Wirkung von Atropin in Kombination mit HI 6

Die Kombination von HI 6 (100 μM) mit Atropin (50 bzw. 100 μM) resultierte in einer leichten Abnahme der Parameter (Abb. 27).

Einen leichten additiven Effekt von 100 μM Atropin und 100 μM HI 6 konnte man bei der LV anhand einer Drucksenkung auf 82% des Ausgangswertes sehen. Signifikant waren die Ergebnisse bei SF und VF im Vergleich zur Alleingabe von 100 μM HI 6.

Auch hier traten keine Arrhythmien auf.

2.3. Wirkung von Atropin in Kombination mit HLö 7

Die Kombination von HLö 7 und Atropin (50 und 100 μM) hatte keinen Einfluß auf die Herzfrequenz, die Druckamplitude hingegen nahm ab (Abb. 28).

Signifikant wurden die Werte bei der LV.

Das Oxim in Kombination mit 50 μM Atropin hatte einen reduzierenden Einfluß um 14% auf den Druck im linken Ventrikel (EKG-Beispiel in Abb. 25). Um weitere 6% wurde der Druck mit 100 μM Atropin und 100 μM HLö 7 gesenkt und kam bei einem Endwert von 78% an. Arrhythmien traten bei diesen Kombinationsversuchen nicht auf.

Start HLö 7 / Atropin

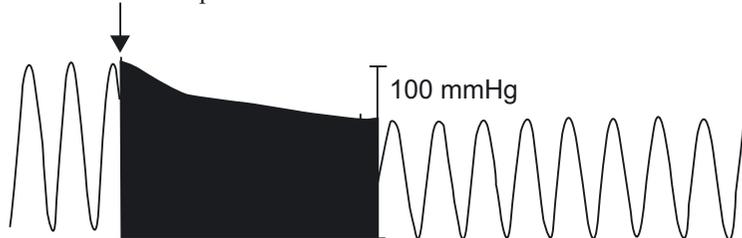


Abb. 25: Wechselwirkung von 100 μ M HLö 7 mit 50 μ M Atropin.
Bei Einzeldosierung von der beiden Substanzen zeigte sich kein signifikanter Einfluß auf die LV.
Anders verhielt es sich jedoch bei der Kombination der beiden Stoffe.
Die LV nahm um 14% ab, was aus dem Originalausschnitt der Aufzeichnungen aus einem Einzelversuch hervorgeht.

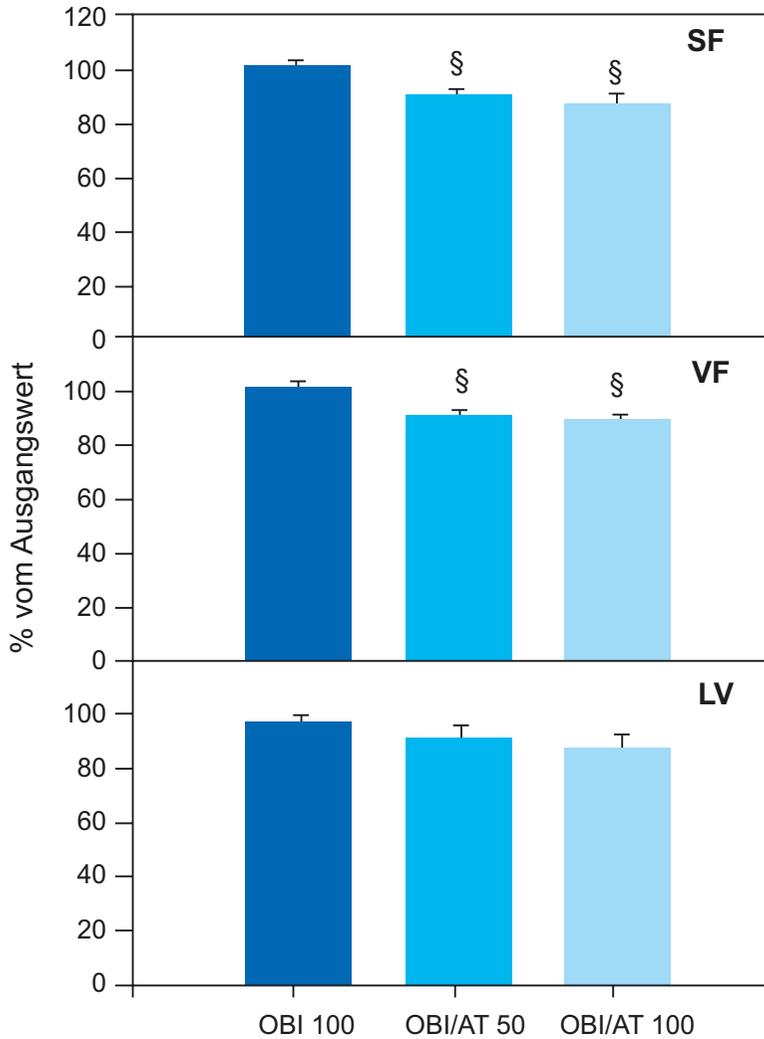


Abb. 26: Wirkung von 100 μ M Obidoxim (OBI) in Gegenwart von 50 μ M oder 100 μ M Atropin (AT) auf SF, VF und LV. Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), $n=6$.
 § = Mann Whitney U-Test : signifikant zu 100 μ M Obidoxim.
 Einzelheiten siehe Legende zu Abb 15

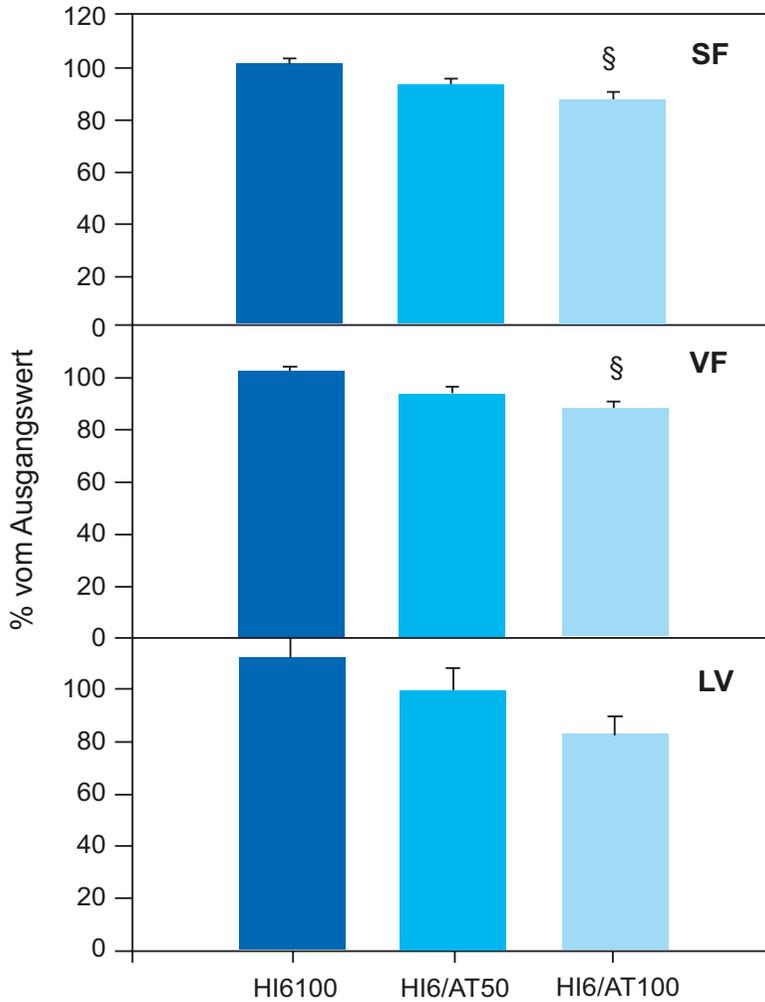


Abb. 27: Wirkung von 100 μ M HI 6 in Gegenwart von 50 μ M oder 100 μ M Atropin (AT) auf SF, VF und LV. Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), $n=6$.
 § = Mann Whitney U-Test : signifikant zu 100 μ M HI 6.
 Einzelheiten siehe Legende zu Abb 15

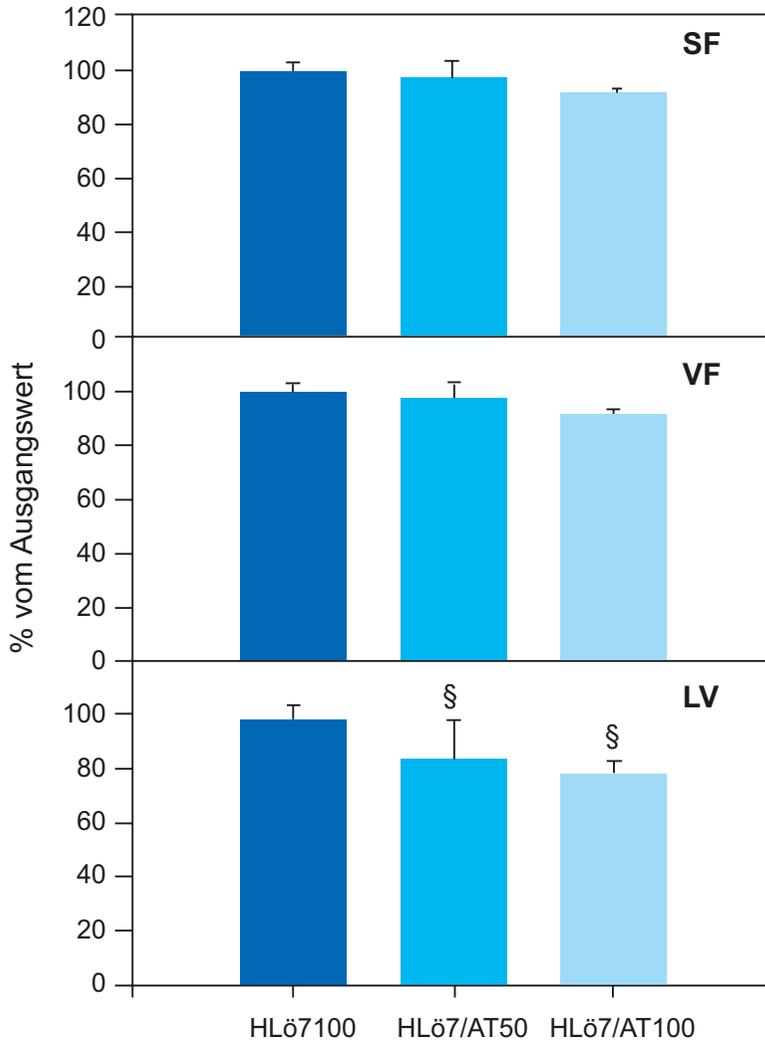


Abb. 28: Wirkung von 100 μM HLö 7 in Gegenwart von 50 μM oder 100 μM Atropin (AT) auf SF, VF und LV. Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), $n=6$.
 § = Mann Whitney U-Test : signifikant zu 100 μM HLö 7.
 Einzelheiten siehe Legende zu Abb 15

3. Wirkung der Antidote in Gegenwart von 100 μM Soman

Nach einer Adaptierungsphase von 30 Minuten wurden die zu untersuchenden Substanzkombinationen für jeweils 10 Minuten in aufsteigenden Konzentrationen zugegeben. Am Ende des Versuchs schloss sich eine Auswaschphase an (Abb. 11).

3.1. Wirkung von Soman bei kumulativer Dosierung

Soman wurde in aufsteigenden Konzentrationen von 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 300 μM und 500 μM nach einer Äquilibrierungszeit von 30 Minuten für je 10 Minuten, ohne Auswaschphase zwischen den einzelnen Dosierungen, verabreicht. Nach der letzten Dosis von 500 μM folgte eine Auswaschphase von 20 Minuten.

SF und VF nahmen kontinuierlich ab. Bei 500 μM betrug der Wert 80% vom Ausgangswert und konnte sich auch in der Auswaschphase nicht mehr erholen. Anders verhielt es sich bei der LV.

Nach einem initialen kontinuierlichen Anstieg um auf 116% vom Ausgangswert bei 100 μM , folgte ein Abfall auf 57% bei 500 μM . Auch in der Erholungsphase fiel der Druck weiter ab.

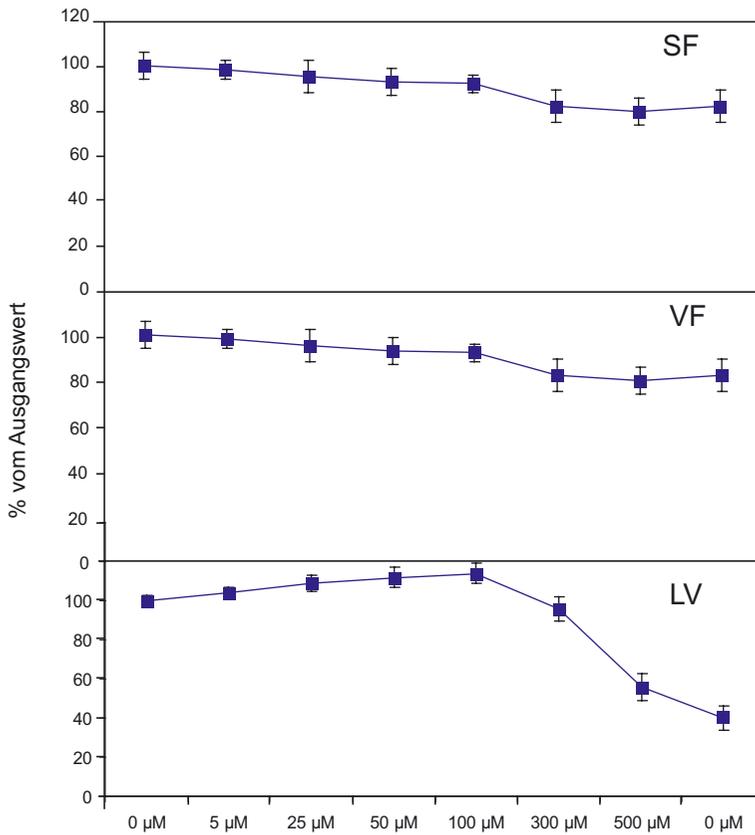


Abb. 29: Wirkung von Soman in aufsteigenden Konzentrationen von 5 μM bis 500 μM auf SF, VF und LV. n=6.

3.2. Wirkung von Soman und Atropin

100 μM Soman und 100 μM Atropin hatten je bei Einzeldosierung keine Wirkung auf SF, VF und LV.

SF und VF waren in Konzentrationen ab 50 μM Atropin und 100 μM Soman signifikant unterschiedlich zu Obidoxim und HLö 7 in Kombination mit Soman (Abb. 30). Bei 100 μM Soman mit 100 μM Atropin sank die linksventrikuläre Druckamplitude auf den Endwert von 33 % vom Ausgangswert (Soman 100 μM) ab.

3.3. Wirkung von Soman und Obidoxim

Die Kombination von Soman und Obidoxim hatte keine nennenswerte Wirkung auf die Herzfrequenz. Die LV reagierte mit einer Abnahme auf 78 % (Abb. 31).

Signifikant waren in dieser Versuchsreihe nur die Vergleiche mit Atropin und HLö 7 in den entsprechenden Dosierungen.

3.4. Wirkung von Soman und HLö 7

Die Kombination von Soman und HLö 7 hatte keinen nennenswerten Einfluß auf die Herzfrequenz. Die LV reagierte mit einer Abnahme auf ca. 70 % (Abb. 32).

Die Signifikanzen wurden in den Punkten 3.2. und 3.3. schon beschrieben.

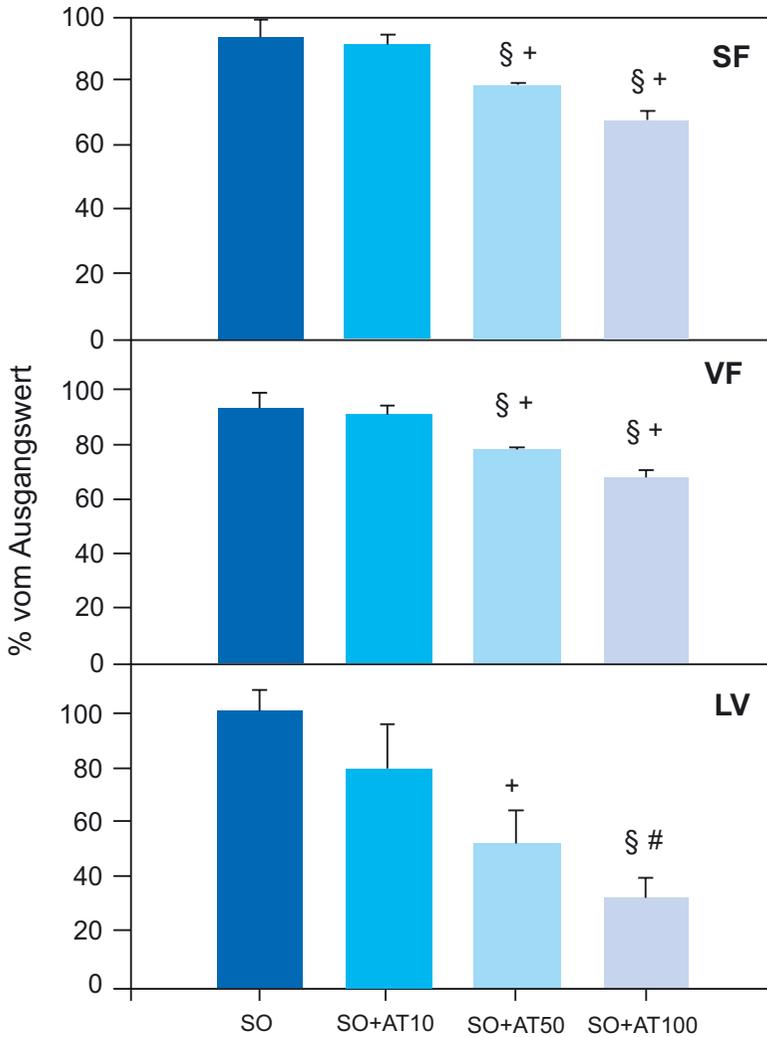


Abb. 30: Bei permanenter Vergiftung mit 100 μ M Soman (SO) wurden nacheinander 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M Atropin (AT) verabreicht und SF, VF und LV aufgezeichnet.

Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), $n=6$:

§ = Mann Whitney U-Test : Soman / Atropin - Soman / Obidoxim (Abb. 31),

+ = Mann Whitney U-Test : Soman / Atropin - Soman / HLö 7 (Abb. 32)

= Wilcoxon matched pairs Test

Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 15.

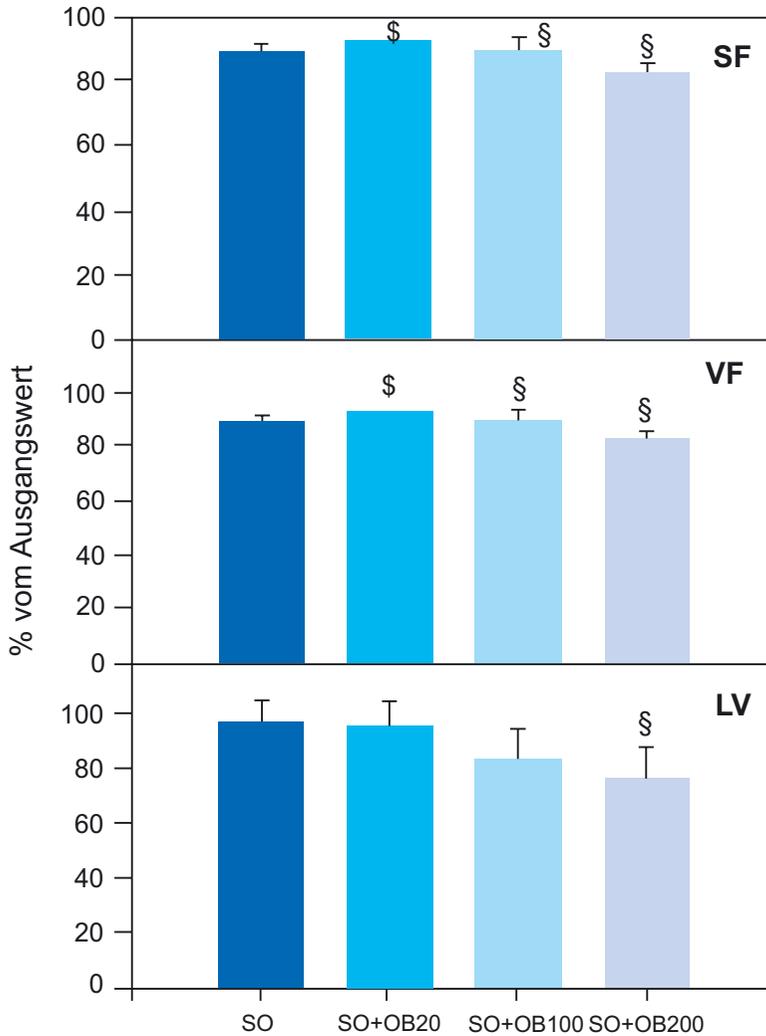


Abb. 31: Bei permanenter Vergiftung mit 100 μ M Soman (SO) wurden nacheinander 20 μ M, 100 μ M und 200 μ M Obidoxim (OB) verabreicht und SF, VF und LV aufgezeichnet.
 Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), $n=6$:
 § = Mann Whitney U-Test : Soman / Obidoxim - Soman / Atropin (Abb. 30)
 § = Mann Whitney U-Test : Soman / Obidoxim - Soman / HL δ 7 (Abb. 32)
 Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 15.

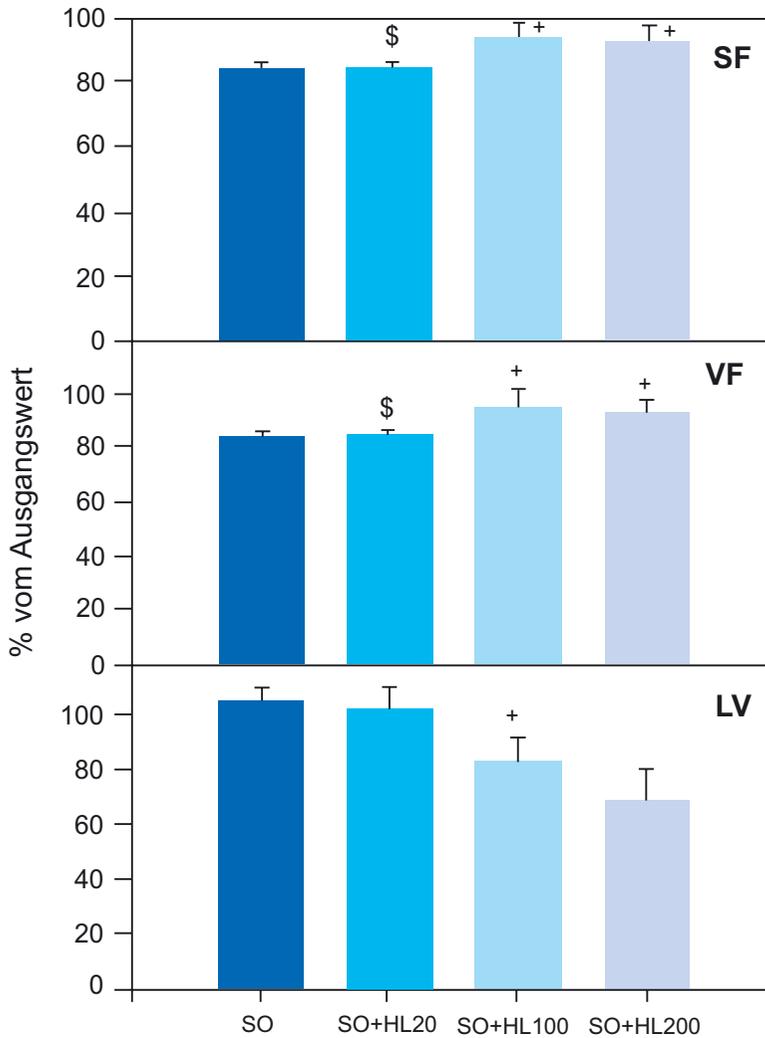


Abb. 32: Bei permanenter Vergiftung mit 100 μ M Soman (SO) wurden nacheinander 20 μ M, 100 μ M und 200 μ M HLö 7 (HL) verabreicht und SF, VF und LV aufgezeichnet.

Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), $n=6$:

+ = Mann Whitney U-Test : Soman / HLö 7 - Soman / Atropin (Abb. 30)

\$ = Mann Whitney U-Test : Soman / HLö 7 - Soman / Obidoxim (Abb. 31)

Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 15.

4. Direkte Wirkung verschiedener Organophosphate und Carbamate

Nach einer Adaptierungsphase von 30 Minuten wurden die zu untersuchenden Organophosphate und das Carbamat Pyridostigmin in kumulativen Dosierungen für je 10 Minuten zugegeben. Am Ende des Versuchs schloss sich eine Auswaschphase an (Abb. 12).

4.1. Wirkung auf Sinusfrequenz und Ventrikelfrequenz

Die kumulative Zugabe von Cholinesterase-Inhibitoren (5-500 μM) führte in allen Fällen, außer bei Malaoxon, zu einer leichten, nicht signifikanten Abnahme der Sinus- und Ventrikelfrequenz. Im Gegensatz zu den anderen Organophosphaten erreichten SF und VF bei 300 μM und 500 μM Malaoxon signifikante Maximalwerte von 120 % (Abb. 33 und 34).

4.2. Wirkung auf die linksventrikuläre Druckamplitude

Die LV war bis 100 μM nahezu unverändert. Erst bei 300 μM und 500 μM kam es bei Soman, VX, Paraoxon und Malaoxon zu einer signifikanten Abnahme dieses Parameters (Abb. 35).

In keinem Fall wurden bradycarde oder tachycarde Rhythmusstörungen beobachtet.

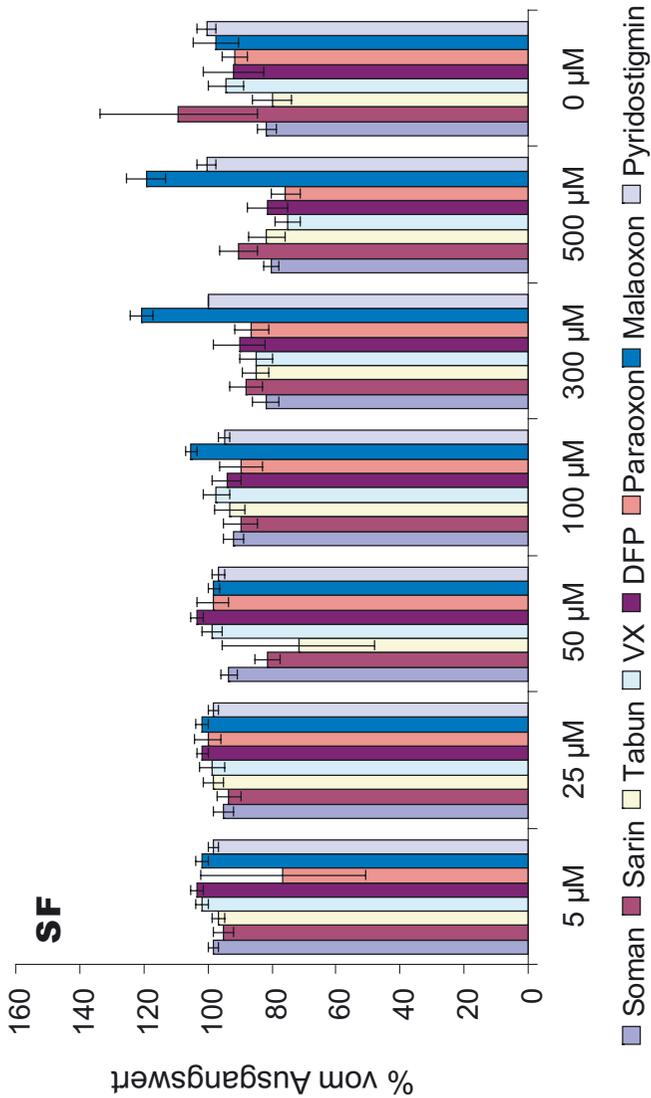


Abb. 33: Direkte Wirkung verschiedener Organophosphate und Carbamate auf die Sinusfrequenz (SF). Angabe der Werte in Prozent vom Ausgangswert.

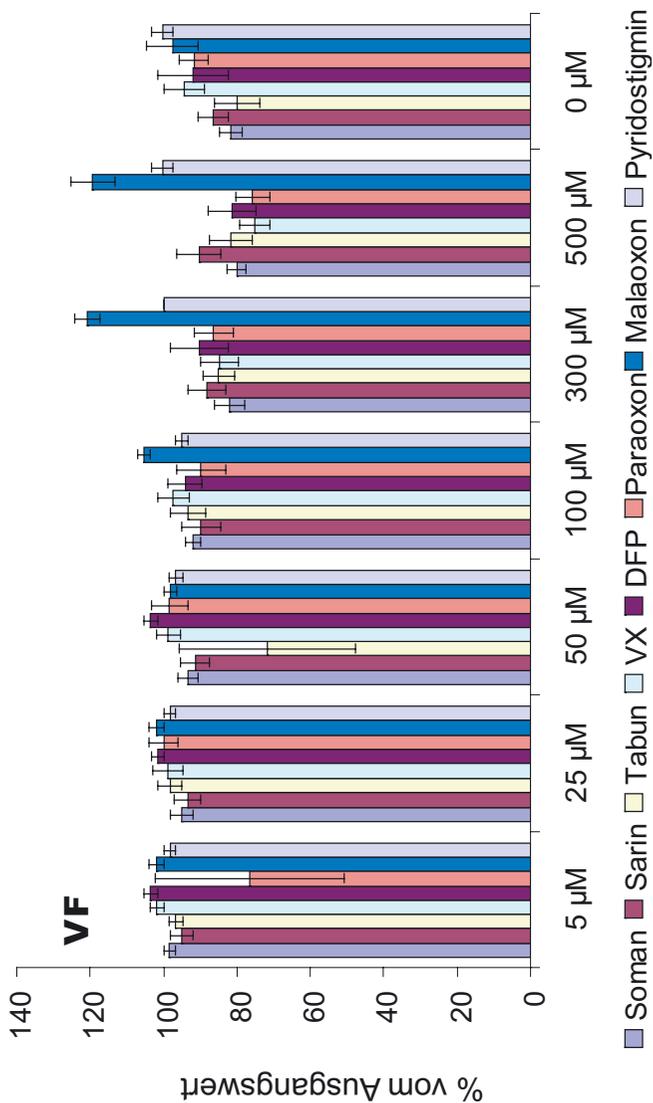


Abb. 34: Direkte Wirkung verschiedener Organophosphate und Carbamate auf die Ventikelfrequenz (VF). Angabe der Werte in Prozent vom Ausgangswert.

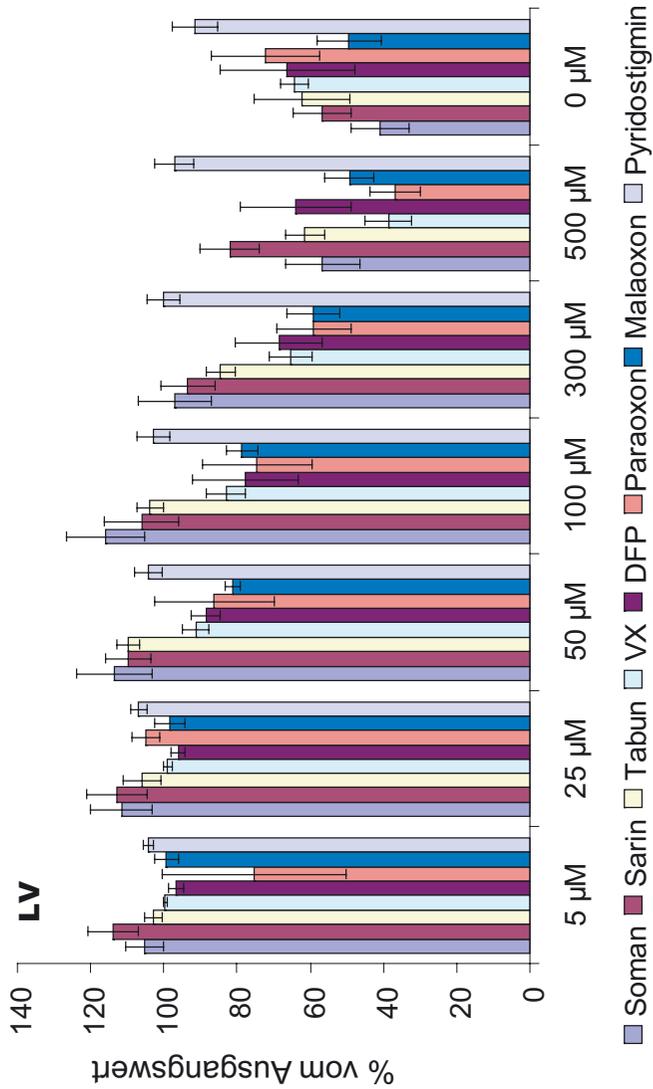


Abb. 35: Direkte Wirkung verschiedener Organophosphate und Carbamate auf die linksventrikuläre Druckamplitude (LV).
Angabe der Werte in Prozent vom Ausgangswert.

5. Wirkung von HLö 7 und HI 6 auf den ATP- und cAMP-Spiegel

5.1 ATP- und cAMP- Spiegel im Herzmuskel

Die ATP- und cAMP-Konzentration im Herzmuskel wurde bei Dosierungen von 50 µM, 300 µM und 1000 µM HLö 7 und HI 6 gemessen.

Die Perfusion mit HLö 7 führte nach 30 Minuten zu einer dosisabhängigen ATP-Abnahme (signifikant bei 300 µM und 1000 µM) auf einen Wert von 51 % (Abb. 36). Die Abnahme des ATP's korrelierte mit der Verringerung der linksventrikulären Druckamplitude (siehe 1.4. Abb. 22).

Der cAMP-Gehalt wurde durch HLö 7 ebenfalls bei 300 µM und 1000 µM signifikant gesenkt. Eine Abnahme des cAMP-Spiegels auf 52% wurde mit der Konzentration von 300 µM HLö 7 erreicht. 1000 µM hatten im Gegensatz zu ATP keinen mindernden, sondern einen steigernden Einfluß auf das cAMP. Hier wurde ein Wert von 74% vom Ausgangswert gemessen (Abb. 37).

HI 6 hatte in den gleichen Dosierungen keinen signifikanten Effekt auf den ATP- und cAMP-Gehalt.

5.2 HLö 7-Spiegel im Perfusat

Die HPLC-Bestimmung der HLö 7-Konzentration im Effluat ergab eine Wiederfindung von 98.7 % ± 0.3%.

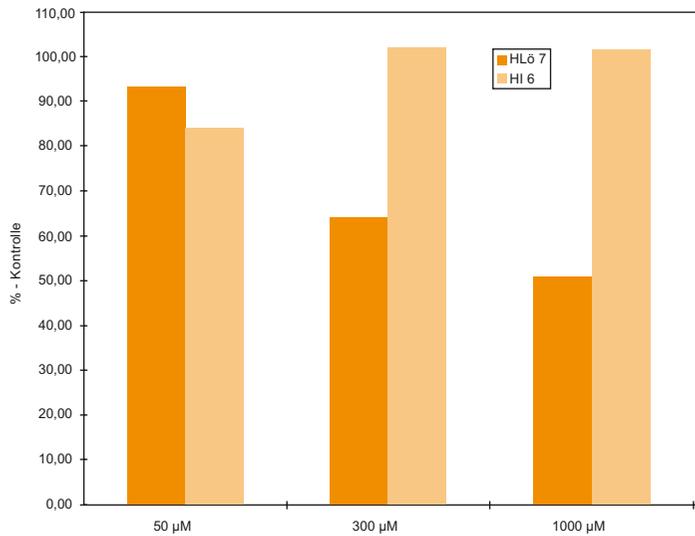


Abb. 36: Nach Perfusion der Meerschweinchenherzen mit je 50 µM, 300 µM, 1000 µM wurde die ATP-Konzentration von HI 6 und HL6 7 im Langendorff-Herz gemessen, (n=6).
Daten in % der ATP-Konzentration unbehandelter Herzen.

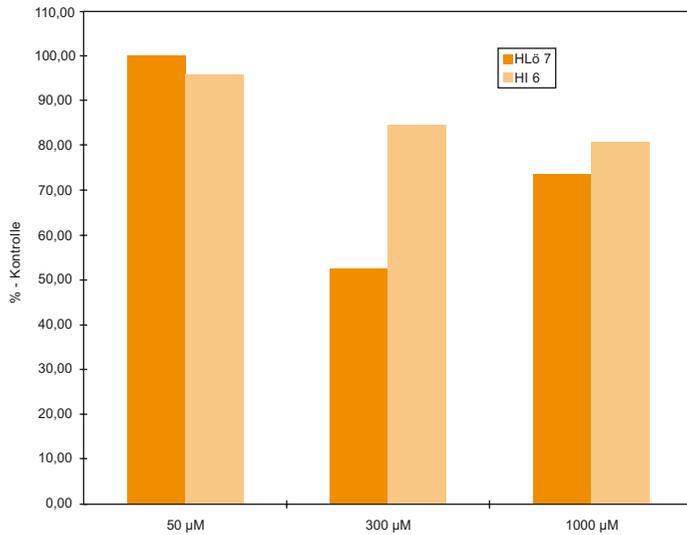


Abb. 37: Nach Perfusion der Meerschweinchenherzen mit je 50 µM, 300 µM, 1000 µM wurde die cAMP-Konzentration von HI 6 und HLö 7 im Langendorff-Herz gemessen, (n=6).
Daten in % der ATP-Konzentration un behandelter Herzen.

IV. DISKUSSION

Die direkten kardialen Wirkungen von Organophosphaten, Oximen und Atropin wurden am isolierten Meerschweinchenherz nach Langendorff untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung haben gezeigt, dass die verwendeten Substanzen in humanrelevanten Konzentrationen, d.h. nanomolar Atropin, 10 - 100 μM Oxim und nanomolar Organophosphat, keine direkten kardialen Wirkungen besitzen.

Eigenwirkung von Atropin, Obidoxim, HI 6 und HLö 7

Mit Atropin wurde die Sinus- und Ventrikelfrequenz in den Einzel- und Kumulativversuchen bis zu einer Konzentration von 1000 μM gesenkt. Das Ausmaß der Reduzierung verhielt sich bei der Einzel-Substratgabe unterschiedlich zur kumulativen Verabreichung von Atropin. Bei kurzer 10-minütiger Perfusion der Meerschweinchenherzen konnte man eine stärkere Senkung von SF und VF beobachten. Hingegen bei der Kumulativdosierung eher eine kontinuierliche Abnahme. Eine Erklärung dafür konnten wir nicht finden, da, wenn man den zeitlichen Aspekt mit einbezieht, die umgekehrte Reaktion zu erwarten gewesen wäre.

Die linksventrikuläre Druckamplitude wurde bei beiden Versuchsreihen relativ gleich stark vermindert.

Dies entspricht auch Untersuchungen mehrerer Forschungsgruppen (Lundy 1979, Klimmek 1986, Worek 1993, 1994 a, 1994 b, 1995 a), die sowohl bei unvergifteten, als auch bei Nervenkeimstoff-verseifteten Tieren bei der Gabe von Oximen und Atropin einen Blutdruckabfall verzeichnen konnten.

Atropin, als nichtselektiver Antagonist muskarinischer Acetylcholinrezeptoren, soll die Muskarin-Rezeptoren z.B. bei einer Organophosphatverseiftung blockieren und somit schützen. Das bewies bereits Baskin 1992 in seinen Untersuchungen.

In unserer Versuchsreihe traten mit steigender Konzentration (100 - 1000 μM) jedoch typische Zeichen einer Überschwemmung mit Acetylcholin, wie es bei einer Intoxikation mit Organophosphaten vorkommt, auf. Es kam zum Verlust der Kontraktilität der Herzmuskulatur, zur Bradycardie bis hin zum totalen AV-Block.

Vor allem bei schwerer Hypoxie und bei verzögertem Behandlungsbeginn ruft Atropin (i.v.) beim organophosphatverseifteten Tier ventrikuläre Tachycardien und Kammerflimmern hervor (Baskin 1992, Krop 1954). In einer Untersuchung von Hayes (1971) verursacht

Atropin (175 µg/kg i.m.) beim Mensch eine reversible AV-Dissoziation ohne andere Arrhythmien. In unseren Versuchen kam es durch Atropin zur Bradycardie bis hin zum AV-Block. Es ist zu beachten, dass Atropin allein oder in Kombination mit anderen Oximen zu tödlichen Arrhythmien bei Organophosphat-Vergiftungen führen kann.

Bei Demirag (2005) wurden die kardialen Effekte von Atropin und Pralidoxim bei der Behandlung von OP-vergifteten Ratten verglichen. Drei Gruppen von je 10 Ratten wurden jeweils narkotisiert, mit einem Pestizid (70 mg/kg) vergiftet und nach 60 Sekunden entweder mit einer Salzlösung, Pralidoxim (20 mg/kg) oder mit Atropin (10 mg/kg) behandelt. In der „Atropingruppe“ kam es im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen zu einem verzögerten Abfall der Herzfrequenz und zu einem späteren Todeszeitpunkt. Die QT-Zeit verhielt sich in allen drei Gruppen gleich.

Die beiden Cholinesterasereaktivatoren Obidoxim und HI 6 verhielten sich bezüglich ihrer Eigenwirkung auf das Langendorff-Herz ähnlich. Hopff et al. (1984) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass sich Obidoxim bei Meerschweinchen, Mäusen und Ratten ähnlich verhält. Obidoxim zeigt sich als wirksames Antidot bei Vergiftungen mit Sarin, nicht mit Soman. Clement et al. (1982), Schoene et al. (1985) und De Jong et al. (1978) kamen in ihren Versuchsreihen zu dem Schluß, daß HI 6 eines der am wenigsten toxischen und am meisten wirkungsvollen Oximen bei einer Somanvergiftung ist. Murray (1989) stellte ebenfalls einen signifikanten therapeutischen Vorteil von HI 6 bei Affen fest. Sowohl Obidoxim als auch HI 6 führten in allen Konzentrationen von 100 - 1000 µM bei beiden Versuchsreihen (einzeln und kumulativ) zu keinen signifikanten Veränderungen von SF und VF. Lediglich die LV reagierte auf die Oximgabe. In den kumulativen Testreihen bewirkten HI 6 und Obidoxim einen signifikanten Druckabfall bei 100 µM. Einer weiteren Konzentrationssteigerung folgte eine nur geringe Abnahme der LV. Anders verhielt es sich bei der Einzelgabe der Substanzen. Obidoxim verursachte einen buntigen Anstieg und Abfall des Ventrikeldrucks. Bei HI 6 kam es nach einer initialen Drucksteigerung zu einer folgenden kontinuierlichen Abnahme. Dies stimmt mit Untersuchungen an narkotisierten Hunden überein (Klimmek 1986). Hier führte die Dosis von 100 µmol/kg HI 6 zu einem gleichmäßigen Abfall des durchschnittlichen Blutdrucks (20 mmHg), der Durchblutung (50%) in der A. femoralis und der LV (20 mmHg). In dieser Versuchsreihe wurden EKG, Atmung, Hämatokrit, arterielle Blutgase und pH-Wert nicht beeinflusst. In unseren Untersuchungen traten weder bei Obidoxim noch bei HI 6 Arrhythmien auf.

HLö 7 hingegen hatte im Vergleich zu Obidoxim und HI 6 mehr Einfluß auf SF, VF und LV. Die Herzfrequenz stieg bei den Einzelversuchen leicht an und nahm bei den Kumulativversuchen gering ab.

Ab einer Konzentration von 500 µM HLö 7 traten Extrasystolen, AV-Block II. und III. Grades, ventrikuläre Tachycardien und Sinusarrhythmien auf.

Die Auswirkungen auf die LV waren signifikant. Der maximale Amplitudenabfall bei 100 µM HLö 7 setzte sich in eine stetige Reduktion bis zur Dosierung von 1000 µM (Kumulativversuche) fort. Bei den Einzelversuchen traten andere Druckverhältnisse auf. Ein rapider Abfall war nur bei der Konzentration von 1000 µM HLö 7 zu sehen.

Im Gegensatz zu Lippstreu (1993) war hier kein Anstieg der LV zu verzeichnen. Übereinstimmend sind die Ergebnisse mit denen von Eyer et al. (1992). Dort wurde in der A. femoralis von narkotisierten Hunden ein länger anhaltender Blutdruckabfall bei i.v.-Dosierung von 50 µmol/kg HLö 7 beobachtet.

Beim Vergleich der drei Oxime Obidoxim, HI 6 und HLö 7 hatte letzteres die größten Auswirkungen auf das Meerschweinchenherz.

Nur bei HLö 7 kam es zu Extrasystolen und AV-Blockierungen (ab 500 µM). Die Kardiotoxizität in Form von Arrhythmien fehlte bei Obidoxim und HI 6. Diese Arrhythmie erzeugenden Konzentrationen von > 500 µM liegen weit über den therapeutisch möglichen Konzentrationen (100 µM). Das Auftreten von Arrhythmien weist auf ein Eingreifen von HLö 7 in die Erregungsleitung und den Ablauf der kardialen Erregung hin.

HLö 7 war das einzige Antidot, das in hohen Dosen zu einer Abnahme der Kontraktilität führte. In einer früheren Studie wurden bereits Rezeptorinteraktionen dieses Oxims untersucht (Lippstreu 1993). Bei Lippstreu ließ sich die HLö 7-Wirkung auf die LV durch die Blockade von Nikotin, α- oder β -Rezeptoren mit Hilfe von Hexamethonium, Phentolamin bzw. Propranolol nicht aufheben, so dass ein Zusammenhang mit adrenergen und cholinergen Rezeptoren unwahrscheinlich ist. Amezcua et al. (1988) haben die Freisetzung des endothelabhängigen Vasodilatators NO auch im Gefäßsystem des isolierten Langendorff-Herzens festgestellt. Der Gefäßtonus reguliert sich durch NO-Freisetzung aus den Endothelzellen (Palmer et al. 1988, Moncada et al. 1991). Möglicherweise kann hier ein Zusammenhang zwischen HLö 7-Wirkung und NO-System gesehen werden (Lippstreu 1993).

Wechselwirkung von Atropin mit den Bispyridiniumoximen

Die Einzelgabe von 100 μM Atropin, Obidoxim, HLö 7 oder HI 6 hatte keinen signifikanten Einfluß auf SF, VF und LV.

Anders hingegen verhielt es sich bei der Kombination von 100 μM Atropin mit 50 μM oder 100 μM Oxim. Bei allen 3 Oximen - Obidoxim, HI 6 und HLö 7 - konnte man einen geringen additiven Effekt bei allen drei Parameter feststellen.

In Kombination mit Atropin konnte bei Vergiftungen mit höheren Sarindosen HLö 7 eine größere therapeutische Wirkung erzielen als HI 6 (Worek 1995). Die Kombinationstherapie Atropin + Oxim verbesserte die Atmung in unterschiedlichem Maß, die Kreislauffunktion und die Überlebenszeit beim Meerschweinchen. Ebenfalls wurden durch HLö 7 die Diaphragma- und Gehirn-AChE mehr reaktiviert als durch HI 6. Im Gegensatz dazu zeigte Worek (1996) in weiteren Untersuchungen, dass die durch Pestizide gehemmte menschliche AChE durch Obidoxim am Besten reaktiviert werden konnte, gefolgt von 2-PAM, HI 6 und HLö 7. Obidoxim und HLö 7 benötigten dazu Konzentrationen von 10 oder 30 $\mu\text{mol/l}$, während 2-PAM und HI 6 jeweils 100 $\mu\text{mol/l}$ benötigten.

In Versuchen am narkotisierten Meerschweinchen fand Worek (1992) heraus, dass die alleinige Therapie mit Atropin oder Oximen bei somanvergifteten Tieren insuffizient war. Hingegen erwies sich die Behandlung mit Atropin und HLö 7 oder Atropin und HI 6 als wirksam. Die Kombination von Atropin mit HI 6 oder HLö 7 verbesserten die Atmung, die Kreislaufsituation und die Überlebenszeit in unterschiedlichem Umfang. Trotz des auffallenden therapeutischen Effekts wurde durch die Antidote keine Reaktivierung der Erythrozyten-AChE beobachtet. Dies stimmt mit Untersuchungen von Hamilton und Lundy (1989) überein. Bei der Somanvergiftung scheint nach Worek (1992) HLö 7 zumindest genauso effektiv zu sein wie das Oxim HI 6. In weiteren Untersuchungen wurde HLö 7 als Breitspektrumantidot besser als HI 6 oder Obidoxim eingestuft (Worek 1994). Dort fand man eine beachtliche Wirkung von Atropin und Obidoxim oder Atropin und HLö 7 auf die Verbesserung von Atmung und Kreislauf nach hohen Tabun-Dosierungen. In Kombination mit Atropin konnte bei Vergiftungen mit hohen Sarindosen HLö 7 eine längere Überlebenszeit erzielen als HI 6 (Worek et al. 1995).

Im Gegensatz dazu registrierte Lundy (1992) eine höhere Wirksamkeit von HI 6 im Vergleich zu Obidoxim in GF (Cyclosarin) vergifteten Meerschweinchen. Bäcker (1997) kam

im Rahmen ihrer Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen. Da die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen oder aus in vitro-Untersuchungen mit tierischem Material insgesamt problematisch ist, wurde deshalb in der Dissertation von Bäcker (1997) die Reaktivierbarkeit humaner Erythrozyten-AChE nach Hemmung mit z.B. Soman oder GF untersucht. GF-gehemmte AChE wurde durch HI 6 sehr gut, durch Obidoxim und Pralidoxim nur geringfügig reaktiviert. Soman-gehemmte AChE wurde lediglich durch HI 6 geringfügig reaktiviert, Obidoxim und Pralidoxim waren völlig unwirksam.

Kassa (2000) fand bei seinen Untersuchungen an somanvergifteten Ratten, dass HI 6 in Kombination mit Atropin somaninduzierte Veränderungen nur ungenügend oder sehr kurz verhindern oder beheben kann. Wirksame Zusätze einer HI 6-Behandlung wären hier jene mit einer starken zentralen antimuskarinen Wirkung, wie z.B. Biperiden oder Scopolamin.

Wirkung von Atropin, Obidoxim und HLö 7 in Gegenwart von 100 µM Soman

Die alleinige Zufuhr von 100 µM Soman hatte bei 10 minütiger Verabreichung nur geringe Effekte auf SF, VF und LV. Bei dieser Konzentration kam es nicht zu dem typischen Vergiftungsbild einer Somanintoxikation.

SF und VF nahmen bei der Therapie mit 10 µM, 50 µM und 100 µM Atropin ab. Die Kontraktilität verringerte sich bei 100 µM Atropin um 70 % (s. Abb. 28).

20 µM Obidoxim führten zu einem initialen Anstieg von SF und VF, gefolgt von einem kontinuierlichen Frequenzverlust bei steigender Konzentration (100 µM und 200 µM). Die LV wurde im Gegensatz zu Atropin bei Höchstdosierung von 200 µM Obidoxim nur auf 80 % reduziert (siehe Abb. 31).

Etwas anders verhielt es sich bei HLö 7 . Ein Frequenzanstieg konnte erst bei der Gabe von 100 µM HLö 7 beobachtet werden, der wiederum in eine Abnahme bei 200 µM überging. Die LV wurde von Therapiebeginn an regelmäßig verringert (siehe Abb. 32).

Eyer et al. fanden bei Sarin oder Soman gehemmter AChE, dass HLö 7 bei einer Konzentration von 30 µmol/l HI 6 überlegen war. Für die Kausaltherapie bei Soman-, Tabun- und GF-Vergiftungen waren bei Lundy (1992) die Oxime in abfallender Reihenfolge wie folgt wirksam: HI 6 > HLö 7 > Obidoxim > 2-PAM.

Die größten Auswirkungen auf die linksventrikuläre Druckamplitude zeigte Atropin, gefolgt von HLö 7.

Ohne nennenswerte Folgen verhielt sich hingegen die Verabreichung von bis zu 200 µM Obidoxim als Reaktivator.

In Untersuchungen am Meerschweinchen (Ganztier) zeigte Lundy (1992), dass HI 6 und HLö 7 wirksame Antidote bei Organophosphatvergiftungen darstellen. Gegen Soman war HI 6 gefolgt von HLö 7 und Pyrimidoxim am wirksamsten, gegen Tabun zeigte HLö 7 im Gegensatz zu HI 6 und Pyrimidoxim eine höhere Effektivität und gegen GF konnten HI 6 und HLö 7 mit sehr gutem Erfolg eingesetzt werden (Lundy 1992). Insgesamt stellte Lundy fest, dass HI 6 ein wirksames Antidot für die Kausaltherapie bei Soman-, Tabun- und GF-Vergiftungen ist, wobei HLö 7 nur geringfügig weniger effektiv war (allerdings wurde das schlecht lösliche HLö 7-Dijodid verwendet).

Die Effektivität einer Oximtherapie bei einer Vergiftung mit Organophosphaten stellt für viele Forschungsgruppen auch weiterhin einen Diskussionspunkt dar. Nach Thiermann (1997) hängt die oft zitierte Ineffektivität von Oximen mit einer ungeeigneten Dosierung zusammen. Aufgrund von in vitro Befunden und theoretischen Überlegungen kam Thiermann zu dem Entschluss, dass Oxime vorzugsweise als durchgehende Infusion nach einem Initialbolus gegeben werden sollten, solange man eine Reaktivierung der gehemmten AChE erwarten kann (Obidoxim wurde dabei bei vergifteten Patienten als i.v.-Bolus mit 250 mg verabreicht, gefolgt von einer Dauerinfusion mit 750 mg/24h). Ebenfalls sollte die Oximgabe unmittelbar nach der Vergiftung erfolgen, da bei einem längerem Zeitintervall (länger als ein Tag) keine Reaktivierung mehr beobachtet werden konnte.

Direkte Wirkung der Organophosphate und Carbamate

In allen Konzentrationsbereichen (5-500 µM) zeigten sich bei den Organophosphaten nur geringe Abnahmen von SF, VF und LV. Bei der linksventrikulären Druckamplitude kam es erst bei Dosierungen ab 300 µM zu einem Kontraktilitätsverlust. Dieser Verlust war am größten bei Paraoxon, gefolgt von VX, Malaaxon, Soman, Tabun, DFP und Sarin. Dies entspricht früher erhobener Daten anderer Untersuchungen der Organophosphate (Übersicht bei Baskin 1992).

Mehrere Studien berichten über die direkte toxische Wirkung der Organophosphate nach Unfällen oder Suizid (Brill et al. 1984, Chabra et al. 1970, Kiss u. Fazekas 1979, Ludomirsky 1982, Nambo 1970, Robineau 1987). Es wurden Sinusbradycardien, schwere ventrikuläre Tachycardien vom „Torsade de pointes“-Typ, QT-Verlängerungen, AV-Dissoziationen, AV-Blockierungen und Kammerflimmern beobachtet. Auch Ballantyne (1992) beobachtete bei einer Vergiftung mit Organophosphaten neben anderen Symptomen ebenfalls Rhythmusstörungen und Kreislaufdepression. Sowohl bei Patienten, als auch bei Versuchstieren traten neben Bradycardien auch tachycarde Rhythmusstörungen (Kammerflimmern) und eine Abnahme der Kontraktilität auf (Baskin 1992). Diese heimtückischen Komplikationen können zu dem verzögert eingetretenen plötzlichen Tod führen (Stunden oder Tage nach der Behandlung mit Atropin oder Atropin und Oxim), nachdem es eigentlich dem Anschein hatte, dass sich die Patienten von den respiratorischen und neurologischen Symptomen einigermaßen erholt hatten und sich auf dem Weg der Besserung befanden (Ludomirsky 1982). Deshalb ist ein achtsames EKG-Monitoring bis zur Normalisierung des QT-Intervalls notwendig. Ludomirsky (1982) beschrieb eine kardiale Toxizität bestehend aus einer 1. Phase mit einer kurzen aber intensiven sympathischen Entladung, gefolgt von einer 2. Phase mit einem extremen parasympathischen Tonus (AV-Block) und bei manchen Patienten eine 3. Phase, in der ventrikuläre Arrhythmien (QT-Intervall-Verlängerung mit Torsade de pointes, pleomorphe ventrikuläre Tachycardien) aufgetreten sind. Ursachen hierfür könnten ein direkter toxischer Effekt der Organophosphate auf die Herzzelle, eine Elektrolytverschiebung, ein hypoxischer Schaden oder eine arrhythmogene Wirkung der Antidote während der Behandlung sein. Bei Kiss u. Fazekas und Ludomirsky (1982) waren die Serumelektrolyte normal. Ludomirsky nimmt an, dass das „QT-Intervall-Torsades-Syndrom“ seinen Ursprung in starken und ungleichen sympathischen Stimulationen von myocardialen Fasern hat. Bethe (1957), Du Bois (1949), Murtha (1964), Salerno (1949) und Wolthius (1968) untersuchten an isoliert perfundierten Herzen oder Vorhöfen unterschiedlicher Tierarten die direkten Wirkungen von verschiedenen Organophosphaten auf die Herzfrequenz und Kontraktilität. Sie stellten fest, dass diese Verbindungen die cardialen Funktionen nur in extrem hohen Konzentrationen beeinflussen. Beweise für einen direkten nicht cholinergen Effekt einer Organophosphat-Verbindung auf den isolierten Ventrikelmuskel beim Meerschweinchen suchten Corbier und Robineau 1989. Sie fanden heraus, dass VX zu einer Hemmung der Na⁺/K⁺-ATP-ase am isolierten Muskel führt und nahmen an, dass dieser Effekt für die organophosphat-induzierten ventrikulären Arrhythmien verantwortlich sei.

Auch bei Abraham (2001) führte eine Sarin- oder Somanvergiftung bei der Ratte zu einer Verlängerung der QT-Dauer und zu lebensbedrohlichen Arrhythmien. Er stellte fest, dass die QT-Intervall-Verlängerungen auf einer unspezifische Aktion an den K⁺-Kanälen und dem Na⁺/Ca²⁺-Austausch beruhen. Pimentel (1992) konnte nach Organophosphat-Vergiftungen morphologische Myocardschäden in unterschiedlichem Ausmaß beim Hamster feststellen. Auch das könnte als Ursache für die Arrhythmien gedeutet werden. Nach Baskin 1992 beruht v.a. die Sinusbradycardie bei einer Organophosphat-Vergiftung auf einer Ansammlung von ACh im synaptischen Spalt bei den muskarinischen Rezeptoren. Diese Bradycardie kann mit Atropin effektiv behandelt werden.

Worek (1995 b) beobachtete an narkotisierten Meerschweinchen nach der Verabreichung von Organophosphaten (z.B. Tabun 5x LD50, Sarin 5x LD50, Soman 5 oder 10x LD50) Sinusbradycardien und einen kompletten AV-Block, gefolgt von einem kammereigenem Rhythmus. Nach der Gabe von Atropin (10 mg/kg) oder Atropin und HI 6 oder HLö 7 (30 µmol/kg) zwei Minuten nach Vergiftung wurde sofort der Sinusrhythmus wiederhergestellt, wenn eine suffiziente Atmung (> 50%) vorhanden war. Bei ateminsuffizienten Tieren traten intermittierend ST-T-Strecken-Veränderungen und AV-Überleitungsstörungen (AV-Block II°) auf.

In einer Studie wertete Karki (2004) kardiale und EKG-Erscheinungsformen einer akuten Organophosphatvergiftung bei 37 Patienten aus. Kardiale Komplikationen traten bei 23 von 37 Patienten (62,2%) auf. Folgende EKG-Abnormalitäten wurden beobachtet: verlängertes QT-Intervall (37,8%), ST-T-Strecken-Veränderungen (29,7%), Reizleitungsdefekte (5,4%), Sinustachycardie (40,5%), Sinusbradycardie (10,8%). Eine Hypertonie wurde bei 5 Patienten, eine Hypotonie bei 4 Patienten gemessen. Von den 14 Patienten mit verlängertem QT-Intervall kam es nur in einem Fall zu einer polymorphen ventrikulären Tachycardie vom „Torsade de pointes“ Typ. Die kardialen Komplikationen traten während der ersten Stunde nach Vergiftung auf. Als prädisponierende Hauptfaktoren beschreibt auch Karki (2004) Hypoxämie, Elektrolytstörung und Azidose. Wie auch Thiermann (1997) stellt Karki die frühzeitige Behandlung in den Vordergrund, um die Mortalität reduzieren zu können. Intensivbehandlung, suffiziente Beatmung und frühzeitige Atropingabe sieht er grundsätzlich als wichtige Therapieoptionen.

Wirkung von HLö 7 und HI 6 auf den ATP- und cAMP-Spiegel

ATP ist mit das wichtigste Molekül zur Energieübertragung im Stoffwechsel aller Lebewesen. Das ATP-Molekül besteht aus einem Adenin-Rest, dem Zucker Ribose und drei Phosphatresten. Diese Phosphatgruppen sind die eigentlichen Energieträger des ATP. Eine Phosphatgruppe besteht aus einem Phosphoratom, das von vier Sauerstoffatomen umgeben ist. Unter Mitwirkung eines Enzyms und Anlagerung eines Wassermoleküls kann die letzte der drei Phosphatgruppen abgespalten werden, wodurch ADP entsteht. Dabei wird Energie freigesetzt. In der Zelle wird daher die Spaltung von ATP in ADP und Phosphat zur Katalyse gleichzeitig ablaufender, energieverbrauchender Reaktionen benutzt, deren Ablauf erst durch diese energieliefernde Spaltung - und die jeweils dazu nötigen Enzyme - möglich wird. Beispiele für solche energieverbrauchenden Reaktionen sind etwa die Leitung von Nervensignalen, die Aktivität von Muskelzellen, die Synthese von Proteinen und die Zellteilung. Für andere Vorgänge beim Zellstoffwechsel wird noch ein weiteres Phosphatmolekül abgespalten, so dass AMP entsteht. Durch das Enzym Adenylatcyclase kann AMP in eine cyclische Form gebracht werden, wobei die Phosphatgruppe mit dem Zucker Ribose einen kleinen, geschlossenen Ring bildet. Dieses so genannte cyclische AMP (cAMP) wirkt in freier Form in den Zellen als Botenstoff. Es reguliert die Aktivität zahlreicher Gene und die Synthese von Enzymen und ist außerdem von großer Bedeutung für die Funktion vieler Hormone.

Da ein Einfluß von Organophosphaten und Oximen auf den Stoffwechsel von cAMP und ATP möglich ist, wurde in ersten orientierenden Untersuchungen untersucht, ob HLö 7 oder HI 6 den Gehalt von energiereichen Phosphaten (ATP) oder von second-messenger Systemen (cAMP) verändern. Sowohl die ATP-, als auch die cAMP-Konzentrationen in HLö 7 perfundierten Herzen nahmen mit zunehmender HLö 7 Konzentration signifikant ab. HI 6 hatte keinen Einfluß auf ATP- oder cAMP-Gehalt. Dieses Ergebnis lässt sich momentan nicht erklären.

In Untersuchungen von Robineau (1987) an MPT (Methylphosphonothiolate) –vergifteten Ratten war der cAMP- und cGMP-Gehalt im myocardialen Gewebe unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Am Mäusehirn wurde von Dinnendahl (1975) beobachtet, dass Arecolin dosisabhängig die cGMP-Konzentration erhöht, ohne den cAMP-Spiegel zu beeinflussen. Eine Abnahme der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität bei der Gabe von P₂S zeigten Untersuchungen von Laufer (1981) bei Ratten. Der cAMP-Gehalt und die Adenylcyclaseaktivität waren hier sowohl bei Oxim- als auch bei Organophosphatverabreichung gleich.

Die Abnahme der ATP- und cAMP-Konzentrationen im Herzmuskel könnten für den Kontraktilitätsverlust des Herzens bei Verabreichung von HLö 7 verantwortlich sein. Eine mögliche Cyanidwirkung konnte ausgeschlossen werden, da durch die Messung des HLö 7-Gehalts im Effluat kein Abbau des Oxims nachgewiesen werden konnte. Nach Untersuchungen von Elliott (1989) kommt es erst bei Cyanidkonzentrationen von 2 mM zu einer Senkung der LV, die ATP-Konzentration bleibt gleich.

Einen weiteren Angriffspunkt könnten die Zellmembranen bieten. Aber in Versuchen wurde nachgewiesen, dass HLö 7 die Zellmembranen in dem Versuchszeitraum von maximal 100 Minuten nicht durchdringt (Worek, persönliche Mitteilung). Also müsste HLö 7 mit membranständigen Rezeptoren interagieren, wofür es aber nach Lippstreu (1993) keinen Hinweis gibt.

Schlussfolgerung

Als zugrundeliegender Mechanismus der oxim-bedingten Kreislaufdepression wurden eine Ganglionblockade (Lundy 1979) und kardiale Wirkungen diskutiert (Klimmek 1986, Worek 1993a). Nach den nun vorliegenden Daten scheinen die untersuchten Oxime allein oder in Kombination mit Atropin nur in sehr hohen Dosen eine direkte Wirkung auf Reizbildung, Reizleitung und Kontraktilität zu haben. Im therapeutischen Bereich (bis 100 µM) wurden keinerlei Veränderungen beobachtet. Dies deckt sich mit einer früheren Untersuchung, in der die Wirkung von HLö 7 im isolierten Herz überprüft wurde (Lippstreu 1993). Die bei Patienten (Baskin 1992) und bei Versuchstieren beobachteten tachycarden Rhythmusstörungen scheinen somit nicht auf direkten kardialen Wirkungen der Organophosphate zu beruhen, sondern vielmehr eine Folge einer regulativen Störung und/oder eines hypoxischen Myokardschadens zu sein.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass das gegenwärtig verwendete Oxim Obidoxim und die potentiellen Nachfolgeoxime HI 6 und HLö 7 bei therapeutischen Dosierungen keine akuten Auswirkungen auf das Reizbildungs- und Reizleitungssystem sowie auf die Kontraktilität haben.

Die Ergebnisse von Eyer et al. (1992) legen nahe, dass bei Intoxikationen mit Organophosphaten HLö 7 in einer Dosis von 10 µM/kg i.v. vom Menschen toleriert wird. Bei Dosierungen von 250-500 mg, die durch einen Autoinjektor verabreicht werden können, ist zu erwarten, dass sich HLö 7 wirksamer erweist als HI 6 (Eyer et al. 1992). Der Gebrauch von Oximen der zweiten Generation (z.B. HI 6, HLö 7) ist aber nur in trocken/naß-Autoinjektoren möglich, da deren Stabilität in einer wässrigen Lösung begrenzt ist (Thiermann 1996). Um dem rapiden Beginn von einer lebensbedrohlichen cholinergen Krise nach einer Vergiftung mit Organophosphaten gewachsen zu sein, sollten Atropin-Oxim-Autoinjektoren zur Verfügung stehen, die eine i.m.-Gabe auch in Abwesenheit eines Arztes erlauben. War dies früher nur auf die Selbst- und Kameradenhilfe im Rahmen kriegerischer Auseinandersetzungen mit dem Einsatz von Nervenkampfstoffen zu sehen, wird die Behandlung von Organophosphatvergiftungen momentan durch die bedrohlich steigende Anzahl terroristischer Anschläge auch für den zivilen Bereich von immer größerer Bedeutung.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Eine Vergiftung mit Organophosphaten führt unter anderem auch zu Rhythmusstörungen und Kreislaufdepression. Eine wesentliche Komplikation der Therapie einer derartigen Vergiftung mit Oximen und Atropin ist im Blutdruckabfall zu sehen. In beiden Fällen ist der zugrundeliegende Mechanismus nicht endgültig geklärt. In der vorliegenden Versuchsreihe wurden die direkten kardialen Wirkungen von Organophosphaten, Oximen und Atropin am isolierten Meerschweinchenherz nach Langendorff untersucht.

Weibliche Pirbright-white Meerschweinchen wurden narkotisiert, das Herz entnommen und in einer geeigneten Apparatur flusskontrolliert, retrograd über die Aorta mit oxygenierter Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung perfundiert. Über Messfühler wurden die Sinusfrequenz, Ventrikelfrequenz und die linksventrikuläre Druckamplitude aufgezeichnet.

Nach beendeter Präparation wurden die Herzen 30 Minuten mit 9 ml/min begaster KRB-Lösung und 1 ml/min NaCl-Lösung perfundiert, bis sie sich auf die extrakorporalen Bedingungen umgestellt hatten und rhythmisch, frequent und konstant schlugen. Die einheitliche Äquilibrierungszeit von 30 Minuten wurde bei jedem Versuch beibehalten. Nach dieser Adaptierungsphase wurden die Ausgangswerte bestimmt. Anschließend wurden die Substanzen als Dauerinfusionen über Perfusionspumpen je nach Versuchsordnung die entsprechende Einwirkzeit lang verabreicht. Am Ende der Versuche schloss sich jeweils eine Auswaschphase von 20 Minuten an.

In der ersten Versuchsreihe wurde die Eigenwirkung von Atropin, Obidoxim, HI 6 und HLö 7 sowohl bei Einzelgabe, als auch bei kumulativer Verabreichung (100-1000 μM) beobachtet.

Atropin hatte ab einer Konzentration von 300 μM Einfluß auf die Herzfrequenz und Druckamplitude. Sinusfrequenz, Ventrikelfrequenz und linksventrikuläre Druckamplitude nahmen signifikant ab. Sinusbradycardie, ventrikuläre Tachycardie und totaler AV-Block wurden bei Konzentrationen ab 500 μM aufgezeichnet. Bei einzelner und kumulativer Atropindosierung waren die beobachteten Ereignisse ähnlich.

Die Oxime HI 6, HLö 7 und Obidoxim (100-1000 μM) beeinträchtigten die Herzfrequenz nur gering. Bei HI 6 und Obidoxim wurde nur bei kumulativer Gabe eine leichte Abnahme der Kontraktilität verzeichnet, bei HLö 7 war dieser Effekt wesentlich stärker ausgeprägt.

Allerdings kam es mit HLö 7 zu einer signifikanten Abnahme der LV bei Einzel- (1000 µM) und kumulativer Gabe (100-1000 µM). AV-Block II. und III. Grades, ventrikuläre Tachycardien und Sinusarrhythmien sah man schon bei 500 µM, bei 1000 µM trat Kammerflimmern auf.

In der nächsten Versuchsanordnung wurde die Wechselwirkung zwischen Atropin und den Bispyridiniumoximen getestet. Zu 100 µM Oxim wurden entweder 50 µM oder 100 µM Atropin gegeben. Die Kombination von Oximen mit Atropin (50 oder 100 µM) verstärkte die Wirkung der Einzelsubstanzen nur geringfügig.

Die Wirkung der Antidote in Gegenwart von 100 µM Soman wurde im Anschluß geprüft. Signifikante Veränderungen waren vor allem bei Atropin zu verzeichnen. Bei der Gabe von 100 µM Atropin zu 100 µM Soman sank die linksventrikuläre Druckamplitude um 67%. Die Kombinationen Soman/ Obidoxim und Soman/ HLö 7 hatten keinen nennenswerten Einfluß auf die Herzfrequenz. Die LV reagierte mit einer Abnahme auf 78% (Soman und Obidoxim) und 70 % (Soman und HLö 7) vom Ausgangswert.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden verschiedene Organophosphate (Soman, Sarin, Tabun, VX, DFP, Paraoxon und Malaaxon) in kumulativen Konzentrationen von 5-500 µM zugegeben. Außer bei Malaaxon waren nur in den höchsten Dosen geringe Wirkungen auf Herzfrequenz, Ventrikelfrequenz und linksventrikuläre Druckamplitude zu beobachten. In keinem Fall traten bradycarde oder tachycarde Rhythmusstörungen auf.

Ergänzend wurde noch untersucht, ob HLö 7 oder HI 6 den Gehalt von energiereichen Phosphaten (ATP) oder von second-messenger-Systemen (cAMP) beeinflusst. HLö 7, jedoch nicht HI 6, führte zu einem signifikanten Abfall des ATP- und cAMP-Gehalts im Herzen. Diese Abnahme bei HLö 7 könnte auch für den Kontraktilitätsverlust verantwortlich sein. Um eine mögliche Cyanidwirkung durch den Abbau von HLö 7 nachweisen zu können, wurde im Effluat der HLö 7-Gehalt gemessen. Diese Messung ergab eine Wiederfindung des Oxims zu 98,7%.

Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Substanzen in humanrelevanten therapeutischen Dosen keine direkten kardialen Wirkungen haben. Die bei hohen HLö 7-Konzentrationen auftretende Kardiodepression könnte mit einem ATP- und cAMP-Verlust korreliert sein.

VI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1 Grundstruktur der Organophosphate nach Schrader
- Abb. 2 Strukturformel von Soman, Sarin und Tabun
- Abb. 3 Strukturformel von Acetylcholin (ACh) und dem Organophosphat VX
- Abb. 4 Symptome der Organophosphatvergiftung
- Abb. 5 Hemmung der AChE durch Soman, Alterung des Soman-AChE-Komplexes und Reaktivierung durch HI 6
- Abb. 6 Strukturformel von Obidoxim, HI 6 und HLö 7
- Abb. 7 Versuchsaufbau
- Abb. 8 Flussdiagramm zur Versuchsdurchführung der Eigenwirkung der Substanzen für Einzelversuche (III.1.), Versuchsdauer 60 Minuten
- Abb. 9 Flussdiagramm zur Versuchsdurchführung der Eigenwirkung der Substanzen für Kumulativversuche (III.1.), Versuchsdauer 100 Minuten
- Abb. 10 Flussdiagramm zur Versuchsdurchführung der Wechselwirkung von Atropin mit den Bispyridiniumoximen (III.2.), Versuchsdauer 60 Minuten
- Abb. 11 Flussdiagramm zur Versuchsdurchführung der Wirkung der Antidote in Gegenwart von 100 μM Soman (III.3.), Versuchsdauer 100 Minuten
- Abb. 12 Flussdiagramm zur Versuchsdurchführung der direkten Wirkung verschiedener Organophosphate und Carbamate (III.4.), Versuchsdauer 100 Minuten
- Abb. 13 Eigenwirkung von 300 μM Atropin (Ausschnitt aus einer Originalkurve)
- Abb. 14 Eigenwirkung von 1000 μM Atropin (Ausschnitt aus einer Originalkurve)
- Abb. 15 Wirkung von einzelnen und kumulativen Atropindosen auf SF, VF und LV
- Abb. 16 Eigenwirkung von 1000 μM Obidoxim (Ausschnitt aus einer Originalkurve)
- Abb. 17 Wirkung von einzelnen und kumulativen Obidoximdosen auf SF, VF und LV
- Abb. 18 Wirkung von einzelnen und kumulativen HI 6-Dosen auf SF, VF und LV
- Abb. 19 Eigenwirkung von 1000 μM HLö 7 (Ausschnitt aus einer Originalkurve)
- Abb. 20 Eigenwirkung von 500 μM HLö 7 (Ausschnitt aus einer Originalkurve)
- Abb. 21 Eigenwirkung von 700 μM (a) und 1000 μM (b) HLö 7 (Ausschnitt aus einer Originalkurve)
- Abb. 22 Wirkung von einzelnen und kumulativen HLö 7-Dosen auf SF, VF und LV
- Abb. 23 Dosis-Wirkungs-Beziehung für Obidoxim, HI 6 und HLö 7 auf SF, VF und LV bei Einzeldosierung

- Abb. 24 Dosis-Wirkungs-Beziehung für Obidoxim, HI 6 und HLö 7 auf SF, VF und LV bei kumulativer Dosierung
- Abb. 25 Wechselwirkung von 100 μM HLö 7 mit 50 μM Atropin auf die LV (Ausschnitt aus einer Originalkurve)
- Abb. 26 Wirkung von 100 μM Obidoxim in Gegenwart von 50 μM oder 100 μM Atropin auf SF, VF und LV
- Abb. 27 Wirkung von 100 μM HI 6 in Gegenwart von 50 μM oder 100 μM Atropin auf SF, VF und LV
- Abb. 28 Wirkung von 100 μM HLö 7 in Gegenwart von 50 μM oder 100 μM Atropin auf SF, VF und LV
- Abb. 29 Wirkung von Soman in Konzentrationen von 5 μM bis 500 μM auf SF, VF und LV
- Abb. 30 Wirkung von 100 μM Soman in Kombination mit Atropin (10 μM , 50 μM , 100 μM)
- Abb. 31 Wirkung von 100 μM Soman in Kombination mit Obidoxim (20 μM , 100 μM , 200 μM)
- Abb. 32 Wirkung von 100 μM Soman in Kombination mit HLö 7 (20 μM , 100 μM , 200 μM)
- Abb. 33 Direkte Wirkung verschiedener Organophosphate und Carbamate auf SF
- Abb. 34 Direkte Wirkung verschiedener Organophosphate und Carbamate auf VF
- Abb. 35 Direkte Wirkung verschiedener Organophosphate und Carbamate auf LV
- Abb. 36 ATP-Konzentration ($\mu\text{mol/g}$) im Herzmuskel nach Perfusion mit HLö 7 oder HI 6
- Abb. 37 cAMP-Konzentration ($\mu\text{mol/g}$) im Herzmuskel nach Perfusion mit HLö 7 oder HI 6

VII. ABKÜRZUNGEN

KRB-Puffer	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
SF	Sinusfrequenz
VF	Ventrikelfrequenz
LV	Linksventrikuläre Druckamplitude
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
HLö 7	1-[[[4-(aminocarbonyl)pyridinio]methoxy]methyl]-2,4-bis[(hydroxyimino)methyl]pyridinium Dimethansulfonat
HI 6	1-[[[4-(aminocarbonyl)pyridinio]methoxy]methyl]-2-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium Dichlorid
Obidoxim	1,1'-(oxydimethylene)bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium) dichlorid
MW ± SE	Arithmetischer Mittelwert ± Fehler des Mittelwertes
p	Wahrscheinlichkeitsbelegung
BuChE	Butyrylcholinesterase
i.v.	intravenös
PGA	3-Phosphoglycerinsäure
DFP	Diisopropylfluorophosphat

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

ABRAHAM, S.; OZ, N.; SAHAR, R.; KADAR, T. (2001)

QTc prolongation and cardiac lesions following acute organophosphate poisoning in rats.
Proc West Pharmacol Soc., 44, 185-186

BÄCKER, M. (1997)

Reaktivierung Organophosphat-gehemmter humaner Erythrozyten-Acetylcholinesterase mit
Bispyridiniumoximen unter besonderer Berücksichtigung der Alterung.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

BALLANTYNE, B.; MARRS, T.C.; ALDRIGE, W.N. (1992)

Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates.
Butterworth und Heinemann, Oxford

BASKIN, S.I.; WHITMER, M.P. (1992)

Cardiac effects of anticholinesterase agents.
In: Ballantyne, B. und Marrs, T.C. (Eds.). Clinical and experimental toxicology of organo-
phosphates and carbamates, Seite 135-144. Butterworth und Heinemann, Oxford

BECKER, G.; KAWAN, A., SZINICZ, L. (1997)

Direct reaction of oximes with sarin, soman or tabun in vitro.
Arch Toxicol. 71, 714-718

BETHE, K.; ERDMANN, W.D.; LENDLE, L.; SCHMIDT, G. (1957)

Spezifische Antidot-Behandlung bei protrahierter Vergiftung mit Alkylphosphaten (Parao-
xon, Parathion, DFP) und Eserin an Meerschweinchen.
Arch. Exp. Path. Pharmakol. 231 , 3-22

BISMUTH, C.; INNS, R.H.; MARRS, T.C. (1992)

Efficacy, toxicity and clinical use of oximes in anticholinesterase poisoning.
In: Ballantyne, B.; Marrs, T.C. (Eds.). Clinical and experimental toxicology of organophos-
phates and carbamates, Seite 555-577. Butterworth und Heinemann, Oxford

BRILL, D.M.; MAISEL, A.S.; PRABHU, R. (1984)

Polymorphic ventricular tachycardia and other complex arrhythmias in organophosphate insecticide poisoning.

J. Electrocardiol. 17, 97-102

CLEMENT, J.G.; HANSEN, A.S.; BOULET, C.A. (1992)

Efficacy of HLö-7 and pyridoxime as antidotes of nerve agent poisoning in mice.

Arch. Toxicol. 66, 216-219

CORBIER, A.; ROBINEAU, P. (1989)

Evidence for a direct noncholinergic effect of an organophosphorous compound on guinea-pig papillary muscles: are ventricular arrhythmias related to a Na⁺/K⁺ATPase inhibition.

Arch. Int. Pharmacodyn. 300, 218-230

DAYRIT, C.; MANRY, C.H.; SEEVERS, M.H. (1948)

On the pharmacology of hexaethyl tetraphosphate.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 92, 173-186

DEMIRAG, K.; CANKAYALI, I.; ERIS, O.; MORAL, A.R.; PEHLIVAN, M. (2005)

The comparison of therapeutic effects of atropine and pralidoxime on cardiac signs in rats with experimental organophosphate poisoning.

Adv Ther., 22(2), 79-86

DINNENDAHL, V.; STOCK, K. (1975)

Effects of arecoline and cholinesterase inhibitors on cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and adenosine 3', 5'-monophosphate in mouse brain.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 297-306

DÖHRING, H.J.; DEHNERT, H. (1985)

Das isolierte perfundierte Warmblütler-Herz nach Langendorff.

In: Methoden der experimentellen Physiologie und Pharmakologie: Biomeßtechnik Heft V.

1. Auflage, Biomeßtechnik-Verlag March, March

DU BOIS, K.P.; DOULL, J.; SALERNO, P.R.; COON, J.M. (1949)

Studies on the toxicity and mechanism of action of p-nitrophenyl diethyl thionophosphate (Parathion).

J. Pharmacol. Exp. Ther. 95, 79-91

ELLIOTT, A.C.; SMITH, G.L.; ALLEN, D.G. (1989)

Simultaneous measurements of action potential duration and intracellular ATP in isolated ferret hearts exposed to cyanide.

Circ. Res. 64, 583-591

**EYER, P.; HAGEDORN, I.; KLIMMEK, R.; LIPPSTREU, P.; OLDIGES, H.; SPÖH-
RER, U.; STEIDL, I.; SZINICZ, L.; WOREK, F. (1992)**

HLö 7 dimethanesulfonate, a potent bispyridinium-dioxime against anticholinesterases.

Arch. Toxicol. 66, 603-621

EYER, P.; LADSTETTER, B.; SCHÄFER, W.; SONNENBICHLER, J. (1989)

Studies on the stability and decomposition of the Hagedorn-oxime HLö 7 in aqueous solution. Arch. Toxicol. 63, 59-67

FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W. (1992)

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage,

Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG, Mannheim

GOODMAN GILMAN, A.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. (1990)

The pharmacological basis of therapeutics. 8th edition, 749-896, Pergamon Press Inc.

HAMILTON, M.G.; LUNDY, P.M. (1989)

HI-6 therapy of soman and tabun poisoning in primates and rodents.

Arch. Toxicol. 63, 144-149

JAWOREK, D.; WELSCH, J. (1987)

UV-method with Phosphoglycerate Kinase. In: Bergmeyer, third edition. Methods of enzymatic analysis, Vol VII, 340-346, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 6940 Weinheim

KARKI, P.; ANSARI, J.A.; BHANDARY, S.; KOIRALA, S. (2004)

Cardiac and electrocardiographical manifestations of acute organophosphate poisoning.
Singapore Med J., 45(8), 385-389

KASSA, J.; FUSEK, J. (2000)

The influence of anticholinergic drug selection on the efficacy of antidotal treatment of so-man-poisoned rats
Toxicology, 154, 67-73

KISS, Z.; FAZEKAS, T. (1979)

Arrhythmias in organophosphate poisonings.
Acta Cardiol. 34, 323-330

KLIMMEK, R.; EYER, P. (1986)

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oxime HI6 in dogs.
Arch. Toxicol. 59, 272-278

KLIMMEK, R.; SZINICZ, L.; WEGER, N. (1983)

Chemische Gifte und Kampfstoffe, 68-83, Hippokrates Verlag, Stuttgart

KROP, ST.; KUNKEL, A.M. (1984)

Observations on pharmacology of the anticholinesterases sarin and tabun.
Proc. soc. exp. Biol. Med 86: 530-33

LANGENDORFF, O. (1895)

Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen.
Pflüglers Arch. ges. Physiol. 61, 291-332

LAUFER, J.; KARMELI, F.; RACHMILEWITZ, D.; SCAPA, E. (1981)

Effect of n-methylpyridinium-2-aldoxime methane sulphonate (P₂S) on rats intestinal, (Na-K)ATPase and adenyl cyclase activities.
Europ. Journal of Pharm. 74, 61-66

LIPPSTREU, P. (1993)

Wirkungen von HLö 7 am isolierten Meerschweinchenherzen nach Langendorff.

Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

LÖFFLER, M. (1986)

Quartäre Salze von Pyridin-2,4-Dialdoxim als Gegenmittel für Organophosphat-Vergiftungen.

Dissertation, Universität Freiburg

LUDOMIRSKY, A.; KLEIN, H.O.; SARELLI, P.; BECKER, B.; HOFFMAN, S.; TAITELMAN, U.; BARZILAI, J.; LANG, R.; DAVID, D.; DI SEGNI, E.; KAPLINSKY, E. (1982)

Q-T prolongation and polymorphous („torsade de pointes“) ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisoning.

Am. J. Cardiol. 49, 1654-1658

LUNDY, P.M.; TREMBLAY, K.P. (1979)

Ganglion blocking properties of some bispyridinium soman antagonists.

Eur. J. Pharmacol. 60, 47-53

LUNDY, P.M.; HANSEN, A.S.; HAND, B.T.; BOULET, C.A. (1992)

Comparison of several oximes against poisoning by soman, tabun and GF.

Toxicology 72, 99-105

MARQUARDT, H.; SCHÄFER, S.G. (1995)

Lehrbuch der Toxikologie. B.I. Wissenschaftsverlag Mannheim

MICROSOFT EXEL (2001)

Version XP

Microsoft Corporation

MODELL, W.; KROP, ST.; HITCHCOCK, P.; RIKER, W.F. (1946)

General systemic actions of di-isopropyl fluorophosphate (DFP) in cats.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 87, 400-413

MURTHA, E.F.; WILLS, J.H. (1964)

The effect of several organophosphorus compound on isolated cardiac muscle.

Arch. Int. Pharmacodyn. 150, 62-66

NAMBA, T.; GREENFIELD, M.; GROB, D. (1970)

Malathion poisoning.

Arch. Environ. Health 21, 533-541

NAMBA, T.; NOLTE, C.T.; JACKREL, J.; GROB, D. (1971)

Poisoning due to organophosphate insecticides.

Am J Med. 50, 475-492

PIMENTEL, J.M.; CARRINGTON DA COSTA, R.B. (1992)

Effects of organophosphates on the heart.

In: Ballantyne, B.; Marrs, T.C. (Eds.). Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates, Seite 145-148, Butterworth und Heinemann, Oxford

ROBINEAU, P. (1987)

Cardiac abnormalities in rats treated with methylphosphonothiolate.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 87, 206-211

ROBINEAU, P.; GUITTIN, P. (1987)

Effects of an organophosphorous compound on cardiac rhythm and haemodynamics in anesthetized and conscious beagle dogs.

Toxicol. Lett. 37, 95-102

SACHS, L. (1992)

Angewandte Statistik. Springer, Berlin

SALERNO, P.R.; COON, J.M. (1949)

A pharmacological comparison of hexaethyl tetraphosphate (HETP) and tetraethyl pyrophosphate (TEPP) with physostigmine, neostigmine and DFP.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 95, 240-255

SCHLAGMANN, C.; ULBRICH, H.; REMIEU, J. (1990)

Bispyridinium(Oxime)compounds antagonize the „ganglion blocking“ effect of the rat.
Arch. Toxicol. 64, 482-489

**SCHUMACHER, A.M.; ZBILUT, J.P.; WEBBER, C.L.jr.; SCHWERTZ, D.W.;
PIANO, M.R. (2006)**

Detection of cardiac variability in the isolated rat heart.
Biol. Res. Nurs. 8(1), 55-66

SILVEIRA, C.L.P.; ELDEFRAWI, A.T.; ELDEFRAWI, M.E. (1990)

Putative M2 muscarinic receptors of rat heart have high affinity for organophosphorous
anticholinesterases.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 103, 474-481

SZINICZ, L.; KULLMANN, R. (1990)

Therapie der Vergiftungen mit hochtoxischen organischen Phosphorverbindungen.
Wehrmed. Mschr. Heft 4, 176-181

SZINICZ, L. (1995)

Chemische Kampfstoffe.
In: Marquardt, H.; Schäfer, S.G.: Lehrbuch der Toxikologie. BI Wissenschaftsverlag, Mann-
heim, 571-588

TAKAHASHI, H.; MAEHARA, K.; ONUKI, N.; SAITO, T.; MARUYAMA, T. (2003)

Decreased contractility of the left ventricle is induced by the neurotransmitter acetylcholine,
but not by vagal stimulation in rats.
Jpn. Heart J., 44(2), 257-270

THIERMANN, H.; RADTKE, M.; SPÖHRER, U.; KLIMMEK, R.; EYER, P. (1996)

Parmakokinetics of atropine in dogs after i.m. injection with newly developed dry/wet com-
bination autoinjectors containing HI 6 or HLö 7.
Arch. Toxicol. 70: 293-299

THIERMANN, H.; MAST, U.; KLIMMEK, R.; EYER, P.; HIBLER, A.; PFAB, R.; FELGENHAUER, N.; ZILKER, T. (1997)

Cholinesterase status, pharmacokinetics and laboratory findings during obidoxime therapy in organophosphate poisoned patients.

Hum. Exp. Toxicol. 16(8), 473-480

VAN HELDEN, H.P.M.; BUSKER, R.W.; MELCHERS, B.P.C.; BRUIJAZEEL, P.L.B. (1996)

Pharmacological effects of oximes: how relevant are they?

Arch Toxicol. 70, 779-786

WOLTHIUS, O.L.; MEETER, E. (1968)

Cardiac failure in the rat caused by diisopropyl fluorophosphate (DFP).

Eur. J. Pharmacol. 2, 387-392

WOREK, F.; SZINICZ, L. (1993a)

Atropine and oxime treatment in lethal soman poisoning of anaesthetized guinea-pigs: HLö 7 dimethanesulfonate versus HI 6 dichloride.

Pharmacol. Toxicol. 72, 13-21

WOREK, F.; KIRCHNER, T.; SZINICZ, L. (1994a)

Treatment of tabun poisoned guinea-pigs with atropine, HLö 7 or HI 6: effect on respiratory and circulatory function.

Arch. Toxicol. 68, 231-239

WOREK, F.; KIRCHNER, T.; SZINICZ, L. (1994b)

Effect of atropine, HLö 7 and HI 6 on respiratory and circulatory function in guinea-pigs poisoned by o-ethyl S-[2-(diisopropylamino)ethyl]methyl-phosphonothioate (VX).

Pharmacol. Toxicol. 75, 302-309

WOREK, F.; SZINICZ, L. (1993)

Investigation of acute cardiovascular and respiratory toxicity of HLö 7 dimethanesulfonate and HI 6 dichloride in anaesthetized guinea pigs.

Pharmacol. Toxicol. 73, 91-95

WOREK, F.; KIRCHNER, T.; SZINICZ, L. (1995a)

Effect of atropine, HLö 7 and HI 6 on respiratory and circulatory function in sarin poisoned guinea-pigs.

Toxicology 95, 123-133

WOREK, F.; KLEINE, A.; FALKE, K.; SZINICZ, L. (1995b)

Arrhythmias in organophosphate poisoning: effect of atropine and bispyridinium oximes.

Arch. Int. Pharmacodyn. 329 (3), 418-435

WOREK, F.; KIRCHNER, T.; BÄCKER, M.; SZINICZ, L. (1996)

Reactivation by various oximes of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus compounds.

Arch. Toxicol. 70, 497-503

Lebenslauf

Name:	Will, geb. Falke	
Vorname:	Katja	
Geburtsdatum:	21.08.1970	
Geburtsort:	Plattling	
Familienstand:	verwitwet, zwei Kinder	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Eltern:	Eberhard und Katharina Falke	
Schulbildung:	1976 – 1979 1980 – 1989 1989	Grundschule in Winzer St.-Gothard Gymnasium in Niederalteich Schulabschluß mit allgemeiner Hochschulreife
	1989 – 1990	Ausbildung bei der Bereitschaftspolizei im nichttechnischen, gehobenen Dienst für die Kriminalpolizei
	1990 – 1991	Eintritt in die Bundeswehr und Ausbildung zum Sanitätsoffizieranwärter
Studium:	1991 – 1993 1993 1993 – 1997 1994 1996 07.11.1997	Studium der Humanmedizin an der Universität in Regensburg Abschluß der Vorklinik mit bestandener Ärztlicher Vorprüfung Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität in München I. Staatsexamen II. Staatsexamen Abschluß des Studiums der Humanmedizin mit bestandenem III. Staatsexamen
Ausbildung:	21.11.1998 – 31.07.1998 01.08.1998 – 14.02.1999 15.02.1999 – 31.07.1999 06.07.1999 01.08.1999 – 31.01.2000 01.02.2000 – 31.07.2000	Ärztin im Praktikum im Bundeswehrkrankenhaus Amberg, Abteilung Innere Medizin Ärztin im Praktikum in der Allgemeinmedizinischen Praxis Dr. H. O. Szika in Winzer Ärztin im Praktikum und Assistenzärztin im Bundeswehrkrankenhaus Amberg, Abteilung Innere Medizin Approbation als Ärztin Assistenzärztin im Bundeswehrkrankenhaus Amberg, Abteilung Chirurgie Assistenzärztin im Bundeswehrkrankenhaus Amberg, Abteilung Anästhesie

	01.08.2000 – 30.11.2002	Truppenärztin im Standortsanitätszentrum in München
	01.12.2002 – 14.01.2006	Elternzeit und Betreuungsurlaub
	24.08.2005	Anerkennung zur Fachärztin für Allgemeinmedizin
	Seit 15.01.2006	Truppenärztin im SanZentrum Fürstenfeldbruck
Promotion:	seit 03.03.2006	Am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (komm. Vorstand Prof. Dr. med. P. Eyer) unter der Leitung von PD Dr. med. F. Worek