

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

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Untersuchungen zur *in-vitro*-Detoxifizierung von
phosphororganischen Verbindungen mit klinisch
verfügbaren Therapeutika**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der
Medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität zu
München

vorgelegt von

Jens Frank von der Wellen-Pawlowski

aus Vechta

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Franz Worek
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Gabriele Sabbioni Prof. Dr. Oliver Peschel
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv.-Doz. Dr. Timo Wille
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	08.02.2018

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Untersuchungen zur *in-vitro*-Detoxifizierung von phosphororganischen Verbindungen mit klinisch verfügbaren Therapeutika“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 20.02.2018

Jens Frank von der Wellen-Pawlowski

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
HINWEIS ZU BEREITS VERÖFFENTLICHTEN TEILEN DER ARBEIT	IV
PUBLIKATIONSLISTE	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Phosphororganische Verbindungen	1
1.1.1 Chemische Struktur	1
1.1.2 Allgemeines	2
1.1.3 Toxikologie, Pharmakokinetik und -dynamik.....	3
1.1.4 Standardtherapie bei Vergiftungen mit OP-Substanzen	6
1.2 Ziel der Arbeit und untersuchte Therapeutika	7
2 ZUSAMMENFASSUNG	10
3 ABSTRACT	11
LITERATURVERZEICHNIS	12

Danksagung

Zu allererst danke ich dem Leiter des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr Herrn Prof. Dr. Horst Thiermann für die Möglichkeit, die Promotion in seiner Einrichtung unter herausragenden Bedingungen anfertigen zu können.

Einen ganz besonderen Dank richte ich an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Franz Worek, der trotz weitreichender anderer Verpflichtungen stets ein offenes Ohr hatte. Er stand mir mit Rat und Tat sowie vielen nützlichen Anregungen und Diskussionen zur Seite, wobei ich von seinem immensen Fachwissen profitieren konnte.

Von ganzem Herzen danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Timo Wille, der die komplette Arbeit begleitete und betreute. Durch seine Anleitung war ein effektives Erlernen und Verbessern des wissenschaftlichen Handwerkszeuges möglich, indem er wertvollen Input u.a. für Versuchsdurchführungen, Problemstellungen und Manuskripterstellung gab. Seine Unterstützung war essentiell für diese Dissertation.

Den Doktoranden des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die vielen unterhaltsamen Gespräche. Stellvertretend sollen in diesem Zusammenhang Anne Bierwisch, Markus Siegert, Simon Lang und Romano Strobelt genannt werden.

Meinen engen, langjährigen Freunden und Kameraden Jan Klocke, Tobias Feldhaus, Luisa Tiedmann, Robert Giesche, Andreas Kranawetvogl und Georg Menacher danke ich für die unerschöpfliche moralische Unterstützung, eine Menge gute Laune und auch viel Spaß außerhalb der Dienstzeit.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes danke ich für die Unterstützung in allen Bereichen. Vor allem Mina Zarrabi, Tamara Hannig und Steffen Müller bleibe ich besonders verbunden. Hervorzuheben sind auch die Kollegen des Geschäftszimmers und insbesondere unser „Spieß“, Stefan Sterr, die durch ihre Hilfestellung meinen Rücken in allen organisatorischen Fragen freigehalten haben.

Meiner Tante und meinem Onkel Marlies und Michael Pawlowski danke ich für den immerwährenden Rückhalt in allen Lebensfragen. Sie standen mir immer zur Seite.

Schlussendlich danke ich meiner Lebensgefährtin Stefanie Herrmann für ihre unbegrenzte Liebe.

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
BChE	Butyrylcholinesterase
CYP	Cytochrom-P
FFP	gefrorenes Frischplasma (fresh frozen plasma)
GMP	Good Manufacturing Practice
HDL	High-Density-Lipoprotein
PON1	Paraoxonase 1
OP	phosphororganisch(e) Verbindung
VR	Russisches VX
WHO	World Health Organisation

Hinweis zu bereits veröffentlichten Teilen der Arbeit

Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine kumulative Dissertation handelt, können die bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlichten Teile aus urheberrechtlichen Gründen nicht erneut veröffentlicht werden. Für den Zugang zu den betreffenden Teilen der Arbeit wird gemäß § 8 Absatz 5 der Promotionsordnung in der Fassung der 11. Änderungssatzung vom 15. September 2016 auf die folgende Publikationsliste verwiesen.

Publikationsliste

Publikationen der kumulativen Dissertation:

1. **von der Wellen, J.**, Worek, F., Thiermann, H., Wille, T. Investigations of kinetic interactions between lipid emulsions, hydroxyethyl starch or dextran and organophosphorus compounds. *Clinical Toxicology* 51, 918 – 922 (2013)
DOI: 10.3109/15563650.2013.857025
2. **von der Wellen, J.**, Bierwisch, A., Worek, F., Thiermann, H., Wille, T. Kinetics of pesticide degradation by human fresh frozen plasma (FFP) in vitro. *Toxicology Letters* 244, 124 – 128 (2016)
DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.07.014
3. Wille, T., **von der Wellen, J.**, Thiermann, H., Worek, F. Pseudocatalytic scavenging of the nerve agent VX with human blood components and the oximes obidoxime and HI-6. *Archives of Toxicology* 91, 1309 – 1318 (2017)
DOI: 10.1007/s00204-016-1776-x

Zusätzliche Publikation:

Worek, F., **von der Wellen, J.**, Musilek, K., Kuca, K., Thiermann, H. Reactivation kinetics of a homologous series of bispyridinium bis-oximes with nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Archives of Toxicology* 86, 1379 – 1386 (2012)

Posterpräsentation:

von der Wellen, J., Worek, F., Thiermann, H., Wille, T. Entgiftung von Nervenkampfstoffen – Studie mit gefrorenem Frischplasma und Lipidemulsion. Posterpräsentation im Rahmen des Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie 2013 in Rostock-Warnemünde. Ausgezeichnet mit dem zweiten Posterpreis.

1 Einleitung

1.1 Phosphororganische Verbindungen

1.1.1 Chemische Struktur

Die chemische Struktur von phosphororganischen Verbindungen ist sehr heterogen. In Abbildung 1 sind der allgemeine strukturelle Aufbau, sowie einige wichtige Beispiele aufgeführt. Alle OP-Verbindungen weisen im Grundsatz folgende Gemeinsamkeiten auf (Black & Harrison, 1996; John et al. 2008):

1. Eine P=O-Gruppe oder eine P=S-Gruppe
2. Eine Abgangsgruppe (X), hydrolyseempfindlich und leicht durch nukleophile Reaktionspartner austauschbar
3. Zwei organische Substituenten (R_1 und R_2)

Verbindungen mit einer P=O-Gruppe werden Organophosphate oder auch Oxone genannt, solche mit einer P=S-Gruppe Organophosphothioate oder auch Thione. Die organischen Gruppen R_1 und R_2 sind meist über ein Sauerstoff- oder ein Schwefelatom mit dem Phosphor verbunden (Organophosphate), können aber auch direkt mit dem Phosphor verbunden sein (Organophosphonate) (Marrs 1993; John et al. 2008).

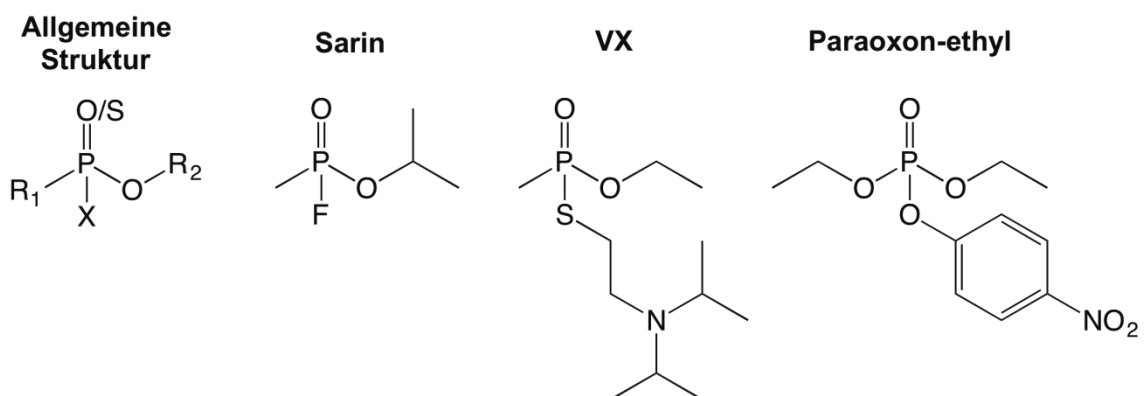


Abbildung 1: Abgebildet ist die allgemeine Struktur von phosphororganischen Verbindungen und einige Beispiele: Als Vertreter der G-Kampfstoffe ist Sarin und aus der Gruppe der V-Kampfstoffe VX gezeigt. Zusätzlich ist das Pestizid Paraoxon-ethyl abgebildet.

1.1.2 Allgemeines

Die Ursprünge der phosphororganischen Nervenkampfstoffe und Pestizide reichen zurück in das Jahr 1937. Gerhard Schrader, Angestellter der IG Farbenindustrie in Deutschland, synthetisierte im Rahmen eines Forschungsprojektes zu Insektiziden mehr als 2000 phosphororganische (OP) Verbindungen, darunter die hoch toxischen G-Kampfstoffe Tabun und Sarin (Szinicz 2005; Worek et al. 2016). Eine umfassende Forschung und Produktion von OP-Verbindungen zum Zwecke des Einsatzes als Nervenkampfstoff und Insektizid fand jedoch erst während und nach dem II. Weltkrieg statt. Sie gipfelte in den 1950er-Jahren in der Entdeckung und Produktion von VX als erstem Vertreter der Gruppe der hoch toxischen V-Kampfstoffe (Tammelin 1957). Im Laufe des Kalten Krieges wurden weltweit große Vorräte an Nervenkampfstoffen hergestellt (Szinicz 2005; Worek et al. 2016). Zum dokumentierten Einsatz kamen Nervenkampfstoffe z.B. im Iran-Irak Krieg, als sie von den Truppen Saddam Husseins gegen die kurdische Zivilbevölkerung eingesetzt wurden (Weimaster et al. 1995; Black et al. 1994; Van Der Schans et al. 2013; Macilwain 1993; Newmark 2004). Bei terroristischen Anschlägen in der japanischen Stadt Matsumoto (Morita et al. 1995) und in der U-Bahn in Tokio durch die Aum-Sekte wurde Sarin eingesetzt (Suzuki et al. 1995). Mit Ende des Kalten Krieges wurde im Rahmen von Abrüstungsvereinbarungen das Chemiewaffenabkommen ausgearbeitet. Dieses trat 1997 in Kraft und bis jetzt haben 98 % aller Staaten weltweit dieses Abkommen unterzeichnet. Es verbietet die Entwicklung, Herstellung, Lagerung und den Einsatz von chemischen Kampfstoffen (United Nations Treaty Collection 1997). Trotz permanenter, andauernder Abrüstung und Vernichtung existieren aufgrund großer Lagermengen jedoch immer noch Bestände. Eine wachsende Gefahr geht in jüngerer Vergangenheit vor allem vom Einsatz chemischer Kampfstoffe durch Terrororganisationen aus. So sind bereits Einsätze von OP-Verbindungen im Zuge des Bürgerkrieges in Syrien dokumentiert (Eisenkraft et al. 2014; Worek & Thiermann 2013).

Neben dem medienwirksamen, militärisch-terroristischen Einsatz stellen OP-Pestizidvergiftungen bei gleichem Wirkmechanismus, aber geringerer Toxizität ein globales Gesundheitsrisiko dar. Insbesondere im ländlichen Raum Asiens ist zumeist

lediglich eine rudimentäre medizinische Versorgung vorhanden und der Zugang zu Pestiziden aufgrund fehlender Sicherheitsvorschriften vergleichsweise einfach. Somit ist die Einnahme von Pestiziden mit etwa 260.000 tödlich verlaufenden Vergiftungen pro Jahr eine der weltweit häufigsten Suizidmethoden, hinzu kommen Fälle von unbeabsichtigter Pestizidintoxikation (Gunnell et al. 2007; Eddleston & Phillips 2004; Eddleston et al. 2005). Zwei Drittel aller Pestizidvergiftungsfälle sind dabei auf phosphororganische Pestizide zurückzuführen (Eddleston 2000). Schätzungen der World Health Organisation (WHO) gehen von bis zu 25 Millionen Landarbeitern in Entwicklungsländern aus, die jährlich Episoden einer Pestizidintoxikation aufzeigen (Jeyaratnam 1990).

Unter dem Aspekt der wachsenden Gefahr terroristischer Anschläge durch Nervenkampfstoffe und der großen Anzahl weltweiter Vergiftungen mit OP-Pestiziden ist die Erforschung und Etablierung effektiver medizinischer Gegenmaßnahmen essentiell.

1.1.3 Toxikologie, Pharmakokinetik und -dynamik

Phosphororganische Verbindungen können durch Inhalation, Verschlucken oder Resorption über die Haut in den Körper gelangen (Kwong 2002). Die Absorption hängt dabei von der Kontaktzeit des Agens, dessen Lipophilie, sowie der eventuellen Anwesenheit eines Lösemittels ab. Nach Verteilung kann es zu einer Akkumulation in Niere, Leber und Fettgewebe kommen. Die stark lipophilen OP-Verbindungen können dabei ein Depot im Fettgewebe ausbilden, wodurch es über einen längeren Zeitraum zur Freisetzung der Substanzen und einer erneuten Symptomatik kommen kann (Vale 1998).

Die Toxizität der OP-Verbindungen liegt in der Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE) begründet. Durch einen nukleophilen Angriff der Hydroxyfunktion des Serin-203 in der katalytischen Triade des aktiven Zentrums der AChE am Phosphylrest des OPs wird dieser kovalent an die AChE gebunden. Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigen, dass die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen am Oxyanion-Loch der AChE (Gly121, Gly122 und Ala 204) essentiell für die Bindung von OP-Substanzen an AChE ist. Bei aromatischen Abgangsgruppen am OP-Molekül ist

die AChE-Inhibition durch π - π -Wechselwirkungen mit Trp86 stärker (Lee & Barron 2016). Die Bindung von OP-Substanzen an AChE führt zu einer irreversiblen Hemmung des Enzyms. Dadurch kann der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) nicht mehr abgebaut werden und kumuliert im synaptischen Spalt von nikotinischen und muskarinischen ACh-Neuronen, was zu einer neuronalen Überstimulation führt (Marrs 1993; Aldridge et al. 1972; Taylor et al. 1995). Im Zuge dessen kommt es zu einer Vergiftungssymptomatik, die nach volatiler Aufnahme über die Schleimhäute relativ schnell und nach perkutaner Resorption mit einer Verzögerung von mehreren Stunden auftreten kann (Lee 2003). Zu den typischen muskarinischen Symptomen zählen u.a. Miosis, Durchfall und Erbrechen, Bradykardie sowie bronchiale Sekretion und Bronchokonstriktion. Nikotinische Symptome sind muskuläre Faszikulationen, Muskelkrämpfe und -lähmung. Hinzu kommen zentralnervöse Symptome wie Ataxie, Psychosen, Tremor, Unruhe und Atemdepression. Ohne Behandlung können Muskellähmung, Bronchokonstriktion und Atemdepression zum Tod durch Atemstillstand führen (Grob 1956; Kwong 2002; Lee 2003; Marrs 1993).

Die OP-gehemmte AChE kann eine Reihe an Reaktionen eingehen (Abbildung 2). Neben der Reaktivierung der AChE durch Oxime (s. Abschnitt 1.1.4) kann es zu einer Reaktivierung durch spontane Hydrolyse oder zu einer sogenannten „Alterung“ kommen. Bei Letzterer wird, in Abhängigkeit von der Struktur der Phosphylgruppe, nach wenigen Minuten bis einigen Tagen spontan ein Alkylrest durch Hydrolyse abgespalten (Worek et al. 2004; Gupta 2015).

Aufgrund der geringen Halbwertszeit der OP-Substanzen im Körper ist ein direkter Nachweis der Substanzen nur in einem kurzen Zeitfenster möglich. (Black & Read 2013). Daher existiert eine Reihe an Biomonitoring-Methoden, um OP-Vergiftungen nachzuweisen. Als Schnelltest hat sich die Messung der Cholinesteraseaktivität bewährt (Worek et al. 1999). Über Addukte von OP-Substanzen mit Proteinen wie Albumin und Butyrylcholinesterase ist ein Nachweis aus Blutplasma zuverlässig auch noch einige Tage bis Wochen nach Exposition möglich. Ein Nachweis der Albuminaddukte ist auch nach einer Oximtherapie realisierbar (Black & Read 2013).

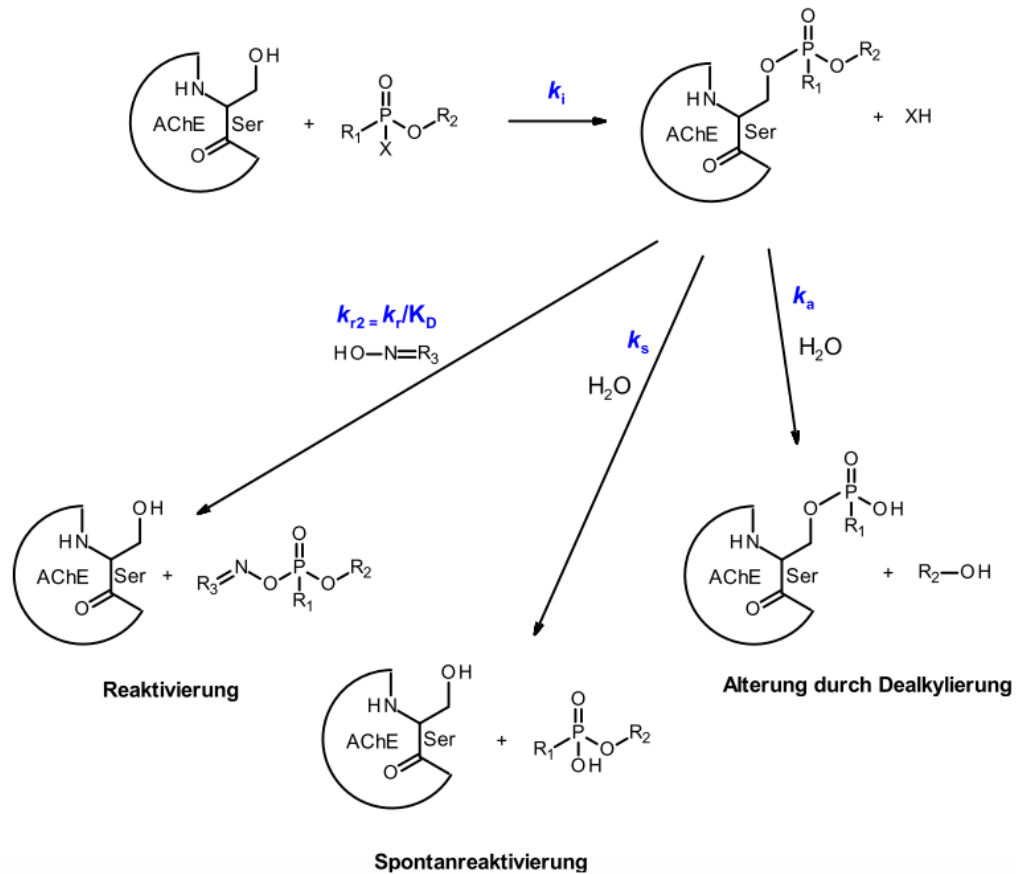


Abbildung 2: Reaktion von phosphororganischen Substanzen mit dem Serinrest im aktiven Zentrum der AChE und kinetische Zusammenhänge (Abbildung übernommen aus (Wille 2015)). Die Hemmung wird beschrieben durch die Hemmkonstante k_i . Der Quotient aus der Reaktivierungskonstante k_r und der Dissoziationskonstante K_D ergibt die Reaktivierungskonstante k_{r2} , welche die Reaktivierungsgeschwindigkeit durch das Oxim beschreibt. Die Geschwindigkeit der Spontanhydrolyse wird durch die Konstante k_s und die der Alterung durch die Konstante k_a ausgedrückt (Worek et al. 2004).

Als OP-Pestizide kommen häufig Thionverbindungen zum Einsatz, welche im Vergleich zu Oxonen isoliert eine niedrige Toxizität aufweisen. Jedoch wirken Thionverbindungen als Prodrug und werden durch CYP P450-Enzyme in der Leber zu den korrespondierenden toxischen Oxonen biotransformiert (Buratti et al. 2003; Sams et al. 2000). Die Geschwindigkeit und Intensität der hepatischen Biotransformation ist aufgrund genetischer Polymorphismen interindividuell verschieden, sodass ein Verlauf der Symptomatik schwer einzuschätzen ist (Eyer et al. 2009). Phosphororganische Verbindungen können durch das im Blutplasma enthaltene Enzym Paraoxonase 1 (PON1) hydrolytisch abgebaut werden. Die Aktivität von PON1 weist dabei ebenfalls große interindividuelle Unterschiede auf und ihre Aktivität ist von der Struktur der OP-Verbindung abhängig. (Rochu et al. 2007).

1.1.4 Standardtherapie bei Vergiftungen mit OP-Substanzen

Die kausale Standardtherapie einer Vergiftung mit phosphororganischen Substanzen umfasst zwei grundlegende Medikamente (Abbildung 3).

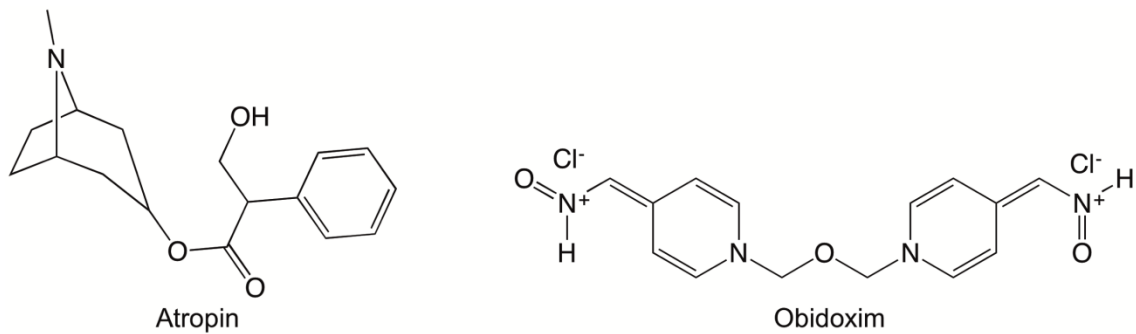


Abbildung 3: Standardtherapie bei Vergiftungen mit phosphororganischen Substanzen. Atropin wirkt als Antagonist an muskarinischen Rezeptoren. Oxime, wie das dargestellte Obidoxim, werden eingesetzt, um die gehemmte AChE zu reaktivieren.

Atropin wird verabreicht, um als kompetitiver Antagonist an muskarinischen Rezeptoren die Wirkung des im synaptischen Spalt akkumulierten ACh abzuschwächen. Oxime werden in der Therapie eingesetzt, um den Phosphylrest von der gehemmten AChE abzuspalten und diese dadurch zu reaktivieren. Im europäischen Raum kommt v.a. das klinisch verfügbare und zugelassene Obidoxim zur Anwendung, während u.a. in Großbritannien, den USA und asiatischen Ländern insbesondere Pralidoxim eingesetzt wird (Elsinghorst et al. 2013). Die Strategie der Oximtherapie ist jedoch umstritten, da sie einige, nachfolgend erläuterte Einschränkungen mit sich bringt. Bis heute konnte noch kein universell wirksames Breitbandoxim gefunden werden, die Wirksamkeit ist vielmehr abhängig von der inkorporierten OP-Verbindung (Worek & Thiermann 2013). So zeigte Pralidoxim bei Vergiftungen mit OP-Pestiziden im Gegensatz zu Obidoxim unzureichende Reaktivierungseigenschaften (Worek et al. 2004; Thiermann et al. 2009; Buckley et al. 2011). Durch Paraoxon, Sarin und VX inhibierte AChE kann durch Obidoxim im therapeutischen Rahmen ausreichend reaktiviert werden. Die Wirksamkeit von Obidoxim ist jedoch beispielsweise bei einer Cyclosarin- oder VR-Vergiftung nicht ausreichend (Worek et al. 2004). Das im Zulassungsprozess befindliche Oxim HI-6 stellt für letztgenannte Vergiftungen eine sinnvolle Therapieergänzung zum Obidoxim dar (Worek et al. 1998, Eyer & Worek

2007). Gealterte AChE (Abbildung 2) kann nicht mehr durch Oxime reaktiviert werden. Eine Oximtherapie sollte daher möglichst schnell nach Exposition eingeleitet werden, um eine Alterung der AChE zu verhindern. Dies ist insbesondere bei einer Somanvergiftung problematisch, bei der eine Alterung innerhalb weniger Minuten eintritt (Worek et al. 2004; Eyer & Worek 2007). Bei einer zu geringen Oximkonzentration kann die Re-Inhibition der AChE durch das Gift schneller verlaufen als die Reaktivierung. Dies ist speziell bei suizidalen Vergiftungen mit hohen Dosen von OP-Pestiziden problematisch (Eyer 2003). Die beschriebenen Aspekte zeigen auf, dass die bestehende Standardtherapie bei OP-Vergiftungen, bestehend aus Atropin und einem Oxim, bis dato großen Limitierungen bei der Wirksamkeit unterworfen ist.

1.2 Ziel der Arbeit und untersuchte Therapeutika

Die beschriebenen Einschränkungen der Standardtherapie von OP-Intoxikationen zeigen den Bedarf für alternative Therapieansätze. Eine Weiterentwicklung stellen stöchiometrische und katalytische Bioscavenger (z.B. Enzyme) dar, welche einen Abbau der OP-Substanzen ermöglichen, bevor diese ins Zielgewebe gelangen und dort die AChE hemmen. Für den therapeutischen Einsatz von Scavengern muss eine Reihe an Voraussetzungen erfüllt sein. Idealerweise weisen sie eine hohe Aktivität und ein breites Wirkspektrum auf. Außerdem muss eine ausreichende Lagerstabilität ohne Verlust an Enzymaktivität erreicht werden. Ein Problem stellt auch die häufig geringe Immuntoleranz gegenüber parenteral verabreichten Enzymen bakterieller Herkunft dar. Die genannten Aspekte machen aufwendige Enzymmodifikationen nötig, trotz derer eine kostengünstige Herstellung unter GMP-Bedingungen (Good Manufacturing Practice) noch möglich sein muss. Eine Marktreife der Scavenger liegt bisher nicht vor (Masson & Rochu 2009a; Masson & Rochu 2009b; Nachon et al. 2013).

Die vorliegende Arbeit befasst sich vor diesem Hintergrund mit *in-vitro*-Untersuchungen zu neuen Therapieansätzen, die auf klinisch bereits verfügbaren Therapeutika basieren. Diese haben im Vergleich zu den beschriebenen Therapiemöglichkeiten den Vorteil, dass sie im Falle einer Wirksamkeit bei OP-Vergiftungen zeitnah in der Therapie eingesetzt werden können. Für bereits

zugelassene Therapeutika wurde eine Unbedenklichkeit im Rahmen von klinischen Studien bereits gezeigt, sodass lediglich eine Indikationserweiterung erwirkt werden müsste. Es kommt zusätzlich der Einsatz im Rahmen des Off-Label-Use in Betracht.

Untersucht wurden Therapeutika, für die in der Literatur eine Wirksamkeit bei OP-Intoxikationen diskutiert wird. Ziel war es, eine Datenbasis für diese Substanzen zu generieren, um einen möglichen therapeutischen Einsatz zu bewerten. Die Auswahl der Substanzen wird im Folgenden kurz erläutert.

Publikationen weisen darauf hin, dass in der Klinik eingesetzte Lipidemulsionen lipophile Arzneistoffe durch Absorption von ihrem Wirkort entfernen und dadurch eine Detoxifizierung erwirken. In einigen Studien konnten bei Psychopharmaka und Lokalanästhetika vielversprechende Ergebnisse erzielt werden (Jamaty et al. 2010; Ozcan & Weinberg 2012; Turner-Lawrence & Kerns 2008). In zwei Publikationen mit OP-Pestiziden wurden jedoch widersprüchliche Ergebnisse gezeigt (Bania et al. 2005; Dunn et al. 2012), weshalb hier unter definierten Bedingungen eine *in-vitro*-Untersuchung der Lipidemulsionen durchgeführt wurde.

Eine Inaktivierung von OP-Substanzen durch Glucosederivate, insbesondere Cyclodextrine, konnte in einigen Studien bereits gezeigt werden (Wille et al. 2009; Elsinghorst et al. 2013). Die zum damaligen Beginn der Studie im klinischen Alltag als Plasmaexpander verfügbaren Glucosederivate Hydroxyethylstärke und Dextran wurden daher hier auf eine mögliche OP-Entgiftung getestet.

Bei gefrorenem Frischplasma (fresh frozen plasma, FFP) handelt es sich um ein klinisch verfügbares Blutprodukt mit vielfältigen Komponenten, das mutmaßlich als stoichiometrischer und katalytischer Scavenger bei OP-Vergiftungen wirksam ist und bereits vielversprechende *in-vitro*-Ergebnisse bei G-Kampfstoffen gezeigt hat (Wille et al. 2014). In Bezug auf OP-Pestizide sind jedoch widersprüchliche *in-vivo*-Studien publiziert worden (Güven et al. 2004; Yilmaz et al. 2013; Pazooki et al. 2011; Pichamuthu et al. 2010). Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation eine *in-vitro*-Untersuchung zur Detoxifizierung von OP-Pestiziden durch FFP durchgeführt.

Abschließend wurde eine mögliche Detoxifizierung durch den parallelen Einsatz von AChE bzw. Butyrylcholinesterase (BChE) aus Blutprodukten und Oximen untersucht.

Dabei binden die stöchiometrischen Scavenger AChE bzw. BChE ein OP-Molekül und werden durch das zugesetzte Oxim reaktiviert. Dadurch stehen die AChE und BChE wieder für eine erneute Bindung eines OP-Moleküls zur Verfügung. Dieser Zyklus aus Bindung und damit Inaktivierung eines OP-Moleküls mit anschließender Reaktivierung von AChE und BChE durch Oxime wird als pseudokatalytisches Scavenging bezeichnet. Die Verabreichung nativer AChE und BChE aus Blutprodukten in Kombination mit bereits klinisch verfügbaren Oximen könnte daher eine vielversprechende Therapieergänzung sein und wurde hier untersucht.

2 Zusammenfassung

Die Standardtherapie bei einer Vergiftung mit phosphororganischen (OP) Substanzen unter Anwendung von Oximen zur Reaktivierung der Acetylcholinesterase (AChE) weist erhebliche Einschränkungen auf. Ein universell einsetzbares Breitbandoxim ist bis dato trotz erheblichen Forschungsbemühungen nicht identifiziert worden. Ziel dieser Arbeit war es daher, neue Therapieansätze unter Anwendung klinisch bereits verfügbarer Therapeutika auf eine mögliche detoxifizierende Wirkung bei OP-Vergiftungen zu untersuchen. Dazu wurde eine photometrische *in-vitro*-Methode in Form eines modifizierten Ellman-Assays eingesetzt.

Ein detoxifizierender Effekt von Lipidemulsionen und den Glucosederivaten Hydroxyethylstärke und Dextran auf diverse Pestizide und G-Kampfstoffe sowie VX wurde untersucht. Es wurde gezeigt, dass die untersuchten Substanzen auf alle getesteten OP-Verbindungen einen stabilisierenden Effekt ausübten und die Spontanhydrolyse deutlich verzögerten. Ein therapeutischer Einsatz kann daher auf Basis der *in-vitro*-Daten nicht empfohlen werden.

Im Zuge vorangegangener Studien wurde gezeigt, dass gefrorenes Frischplasma (FFP) G-Kampfstoffe *in vitro* rapide abbauen kann. Daher wurde hier der Abbau von strukturverwandten OP-Pestiziden untersucht. Der entgiftende Effekt hing dabei sowohl vom jeweiligen Pestizid, als auch von der verwendeten FFP-Charge ab. Der Einsatz von FFP ist somit nur bei einer Intoxikation mit bestimmten Pestiziden eine Therapieoption.

Das pseudokatalytische Scavenging stellt eine Weiterentwicklung etablierter Therapiemethoden dar. Dabei wird AChE und Butyrylcholinesterase (BChE) aus Blutprodukten in Kombination mit einem Oxim verabreicht. Die OP-Verbindung bindet an die AChE und BChE und wird dadurch abgebaut. Das Oxim reaktiviert die Cholinesterasen, sodass diese erneut für den Abbau zur Verfügung stehen. Die Wirksamkeit von AChE und BChE aus verschiedenen Blutprodukten in Kombination mit den Oximen HI-6 und Obidoxim bei VX-Vergiftungen wurde hier untersucht. Der Einsatz von Erythrozytenkonzentrat und FFP (1:1 gemischt) mit dem Oxim HI-6 zeigte den schnellsten Abbau und stellt möglicherweise eine ergänzende Therapieoption dar.

3 Abstract

The therapy of intoxications with organophosphorus (OP) compounds involving the use of oximes to reactivate acetylcholinesterase (AChE) shows major limitations. An oxime with a broad spectrum is still missing. Therefore, in this thesis new treatment options in OP-poisoning involving promising, clinically available therapeutics were investigated with a modified Ellman-assay *in vitro*.

Lipid emulsions and the glucose derivatives hydroxyethylstarch and dextran stabilized various G-type nerve agents and VX compared to spontaneous hydrolysis and can therefore not be recommended as a therapy option in OP-poisoning.

Previous studies showed a beneficial *in vitro* effect of fresh frozen plasma (FFP) in detoxifying G-type nerve agents. Hence, we investigated the impact of FFP on the degradation of several OP-pesticides, which are structurally related to nerve agents. The detoxifying effect of FFP depended on the specific pesticide and the FFP batch used. In conclusion, the use of FFP in therapy of OP-pesticide poisoning should be further investigated in cases of intoxication with some particular pesticides.

Pseudocatalytic scavenging of VX using AChE and butyrylcholinesterase (BChE) from blood products in combination with an oxime is an advancement of consisting methods in therapy. The cholinesterases bind and detoxify OP as a stoichiometric scavenger. Subsequent reactivation by an oxime enables AChE and BChE to bind another OP-molecule. In this setting the effect of AChE and BChE from several blood products in combination with the oximes obidoxime and HI-6 was investigated. Packed red blood cells and FFP (mixed 1:1) combined with the oxime HI-6 showed the most rapid degradation of VX and might therefore be an interim solution in OP-poisoning.

Literaturverzeichnis

Aldridge, W.N., Reiner, E. Enzyme inhibitors as substrates. In: *Frontiers of Biology* 26 (Editors: Neuberger, A., Tatum, E.L.) (1972).

Bania, T.C., Chu, J., Stolbach, A. The effect of intralipid in organophosphate toxicity in mice. *Saem Annual Meeting Abstracts*, 12 (2005).

Black, R.M., Clarke, R.J., Read, R.W., Reid, M.T.J. Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve agent sarin, sulphur mustard and their degradation products. *Journal of Chromatography A* 662, 301–321 (1994).

Black, R., Harrison, J. The chemistry of organophosphorus chemical warfare agents. In: *The Chemistry of Organophosphorus Compounds* (Editor: F. Hartley), John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, 781–840 (1996).

Black, R. M. & Read, R. W. Biological markers of exposure to organophosphorus nerve agents. *Archives of Toxicology* 87, 421–437 (2013).

Buckley, N.A., Eddleston, M., Li, Y., Bevan, M., Robertson, J. Oximes for acute organophosphate pesticide poisoning. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2, CD005085 (2011).

Buratti, F.M., Volpe, M.T., Meneguz, A., Vittozzi, L., Testai, E. CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 186, 143–154 (2003).

Dunn, C., Bird, S.B., Gaspari, R. Intralipid fat emulsion decreases respiratory failure in a rat model of parathion exposure. *Academic Emergency Medicine* 19, 504–509 (2012).

Eddleston, M., Eyer, P., Worek, F., Mohamed, F., Senarathna, L., von Meyer, L., Juszczak, E., Hittarage, A., Azhar, S., Dissanayake, W., Rezvi Sheriff, M.H., Szinicz, L., Buckley, N.A. Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: A prospective cohort study. *Lancet* 366, 1452–1459 (2005).

Eddleston, M. Patterns and problems of deliberate self-poisoning in the developing world. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians* 93, 715–731 (2000).

Eddleston, M., Phillips, M.R. Self poisoning with pesticides. *British Medical Journal* 328, 42–44 (2004).

Eisenkraft, A., Gilburd, D., Kassirer, M., Kreiss, Y. What can we learn on medical preparedness from the use of chemical agents against civilians in Syria? *American Journal of Emergency Medicine* 32, 186 (2014).

Elsinghorst, P.W., Worek, F., Thiermann, H., Wille, T. Drug development for the management of organophosphorus poisoning. *Expert Opinion on Drug Discovery* 8, 1467–1477 (2013).

Eyer, F., Roberts, D.M., Buckley, N.A., Eddleston, M., Thiermann, H., Worek, F., Eyer, P. Extreme variability in the formation of chlorpyrifos oxon (CPO) in patients poisoned by chlorpyrifos (CPF). *Biochemical Pharmacology* 78, 531–537 (2009).

Eyer, F., Worek, F., Eyer, P., Felgenhauer, N., Haberkorn, m., Zilker, T., Thiermann, H. Obidoxime in acute organophosphate poisoning: 1-clinical effectiveness. *Clinical Toxicology* 47, 807–813 (2009).

Eyer, P. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicological Reviews* 22, 165–190 (2003).

Eyer, P., Worek, F. Oximes. In: *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*, 2nd edition (Editors: Marrs, T.C., Maynard, R.L., Sidell, F.R.), John Wiley & Sons, Hoboken, 305–330 (2007).

Grob, D. The manifestations and treatment of poisoning due to nerve gas and other organic phosphate anticholinergic compounds. *Archives of Internal Medicine* 98, 221–239 (1956).

Gunnell, D., Eddleston, E., Phillips, M.R., Konradsen, F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review. *BMC Public Health* 7, 357 (2007).

Güven, M., Sungur, M., Eser, B., Sari, I., Altuntas, F. The effects of fresh frozen plasma on cholinesterase levels and outcomes in patients with organophosphate poisoning. *Clinical Toxicology* 42, 617–623 (2004).

Jamaty, C., Bailey, B., Larocque, A., Notebaert, E., Sanogo, K., Chauny, J.M. Lipid emulsions in the treatment of acute poisoning: a systematic review of human and animal studies. *Clinical Toxicology* 48, 1–27 (2010).

Jeyaratnam, J. Acute pesticide poisoning: A major global health problem. *World Health Statistics Quarterly* 43, 139–144 (1990).

John, H., Worek, F., Thiermann, H. LC-MS-based procedures for monitoring of toxic organophosphorus compounds and verification of pesticide and nerve agent poisoning. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 97–116 (2008).

John, H., Balszuweit, F., Kehe, K., Worek, F., Thiermann, H. Toxicokinetic aspects of nerve agents and vesicants. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* (Editor: Gupta, R.), 2nd edition, Elsevier, Amsterdam, 817–856 (2015).

Kwong, T.C. Organophosphate pesticides: Biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring* 24, 144–149 (2002).

Lamb J.C., Steinberg, G.M., Hackley, B.E. Isopropyl methylphosphonylated bisquarternary oximes; powerful inhibitors of cholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta* 89, 174–176 (1964).

Lee, E.C. Clinical Manifestations of Sarin Nerve Gas Exposure. *Journal of the American Medical Association* 290, 659–662 (2003).

Lee, S., Barron, M. A mechanism-based 3D-QSAR approach for classification and prediction of acetylcholinesterase inhibitory potency of organophosphate and carbamate analogs. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 30, 347-363 (2016)

Macilwain, C. Study proves Iraq used nerve gas. *Nature* 363, 3 (1993).

Marrs, T.C. Organophosphate poisoning. *Pharmacology and Therapeutics* 58, 51–66 (1993).

Masson, P., Rochu, D. Catalytic bioscavengers: The next generation of bioscavenger-based medical countermeasures. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* (Editor: Gupta, R.), 1st edition, Elsevier, Amsterdam, 1053–1065 (2009a).

Masson, P., Rochu, D. Catalytic bioscavengers against toxic esters, an alternative approach for prophylaxis and treatments of poisonings. *Acta Naturae* 1, 68–78 (2009b)

Maxwell, D.M., Saxena, A., Gordon, R.K., Doctor, B.P. Improvements in scavenger protection against organophosphorus agents by modification of cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions* 119–120, 419–428 (1999).

Morita, H., Yanagisawa, N., Nakajima, T., Shimizu, M., Hirabayashi, H., Okudera, H., Nohara, M., Midorikawa, Y., Mimura, S. Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. *Lancet* 346, 290–293 (1995).

Nachon, F., Brazzolotto, X., Trovaslet, M., Masson, P. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chemico-Biological Interactions* 206, 536–544 (2013).

Newmark, C.J. The birth of nerve agent warfare: Lessons from Syed Abbas Foroutan. *Historical Neurology* 62, 1590–1596 (2004).

Ozcan, M.S., Weinberg, G. Intravenous lipid emulsion for the treatment of drug toxicity. *Journal of Intensive Care Medicine* 29, 59–70. (2012).

Pazooki, S. Solhi, H., Khoddami Visteh, H.R., Shadnia, S., Bahram Beigi, M.J. Effectiveness of fresh frozen plasma as supplementary treatment in organophosphate poisoning. *Medical Journal of Malaysia* 66, 342–345 (2011).

Pichamuthu, K., Jerobin, J., Nair, Anupama, John, G., Kamalesh, J., Thomas, K., Jose, A., Fleming, J.J., Zachariah, A., David, S.S., Daniel, D., Peter, J.V. Bioscavenger therapy for organophosphate poisoning - an open-labeled pilot randomized trial comparing fresh frozen plasma or albumin with saline in acute organophosphate poisoning in humans. *Clinical Toxicology* 48, 813–819 (2010).

Rochu, D., Chabrière, E., Masson, P. Human paraoxonase: A promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. *Toxicology* 233, 47–59 (2007).

Sams, C., Mason, H.J., Rawbone, R. Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxicology Letters* 116, 217–221 (2000).

Van Der Schans, M.J., Hulst, A.G., van der Riet – van Oeveren, D., Noort, D., Benschop, H.P., Dishovsky, Ch. New tools in diagnosis and biomonitoring of intoxications with organophosphorothioates: Case studies with chlorpyrifos and diazinon. *Chemico-Biological Interactions* 203, 96–102 (2012).

Suzuki, T., Morita, H., Ono, K., Maekawa, K., Nagai, R., Yazaki, Y. Sarin poisoning in Tokyo subway. *Lancet* 345, 1446–1447 (1995).

Szinicz, L., 2005. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* 214, 167–181 (2005).

Tammelin, L.E. Dialkoxy-phosphorylthiocholines, alkoxy-methyl-phosphorylthiocholines and analogous choline esters. Syntheses, pK_a of tertiary homologues and cholinesterase inhibition. *Acta Chemica Scandinavia* 11, 1340–1349 (1957).

Taylor, P., Radic, Z., Hosea, N.A., Camp, S., Marchot, P., Berman, H.A. Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicology Letters* 82/83, 453–458 (1995).

Turner-Lawrence, D.E., Kerns, W. Intravenous fat emulsion: A potential novel antidote *Toxicology Reviews* 4, 109–114 (2008).

United Nations Treaty Collection, Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction (1997).

https://treaties.un.org/pages/ViewDetails.aspx?src=TREATY&mtdsg_no=XXVI-3&chapter=26&clang=_en. Abgerufen am 14.02.2017.

Vale, J.A., Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters* 102/103, 649–652 (1998).

Weimaster, J.F., Beaudry, W.T., Bossle, P.C., Ellzy, M.W., Janes, L.G., Johnson, D.W., Lochner, J.M., Pleva, S.G., Reeder, J.H., Rohrbaugh, D.K., Rosso, T.E., Szafraniec, L.J., Szafraniec, L.L., Albro, T.G., Creasy, W.R., Stuff, J.R., Smith, P.B., Stewart, I.R. Chemical analysis of environmental samples collected in Iraq: Analysis for the presence of chemical warfare agents. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 64, 115–128 (1995).

Wille, T., Arzneimittelforschung zur Therapie von Organophosphatvergiftungen. Habilitationsschrift an der Technischen Universität München (2015).

Wille, T., Tenberken, O., Reiter, G., Müller, S., Le Provost, R., Lafont, O., Estour, F., Thiermann, H., Worek, F. Detoxification of nerve agents by a substituted β -cyclodextrin: Application of a modified biological assay. *Toxicology* 265, 96–100 (2009).

Wille, T., Thiermann, H., Worek, F. In vitro kinetics of nerve agent degradation by fresh frozen plasma (FFP). *Archives of Toxicology* 88, 301–307 (2014).

Worek, F., Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochemical Pharmacology* 68, 2237–2248 (2004).

Worek, F., Widman, R., Knopff, O., Szinicz, L. Reactivating potency of obidoxime, pralidoxime, HI 6 and HLö 7 in human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by highly toxic organophosphorus compounds. *Archives of Toxicology* 72, 237–243 (1998).

Worek, F., Wille, T., Koller, M., Thiermann, H. Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat. *Archives of Toxicology* 90, 2131–2145 (2016).

Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C. & Eyer, P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinical Chimica Acta* 288, 73–90 (1999).

Worek, F., Thiermann, H. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacology and Therapeutics* 139, 249–259 (2013).

Yilmaz, M., Sebe, A., Oguzhan, M., Gumusay, U., Topal, M., Atli, M., Icme, F., Satar, S. Effectiveness of therapeutic plasma exchange in patients with intermediate syndrome due to organophosphate intoxication. *American Journal of Emergency Medicine* 31, 953–957 (2013).