

# Působení atropinu a diazepamu na savčí nervosvalové ploténce – model jejich ochranného působení při otravě bojovými a zemědělskými anticholinesterázami

**František Vyskočil**

*Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky*

*Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova*

---

## SOUHRN

Je popsáno nikotinové působení atropinu při léčení otrav nervově paralytickými látkami (NPL). Atropin výrazně zkracuje ploténkové potenciály na nervosvalovém spojení blokadou otevřeného nikotinového kanálu a efektivně působí proti účinku NPL (Beránek, Vyskočil, 1968 – Magazanik, Vyskočil, 1969). Diazepam zvyšuje chloridovou propustnost excitabilní membrány a eliminuje opakovaný vznik akčních potenciálů (trainů) při otravě anticholinesterázami (Vyskočil 1977).

*Klíčová slova:* diazepam, atropin, anticholinesterázy, nervosvalová ploténka, svalová membrána

## SUMMARY

The effect of atropine and diazepam on the mammalian neuromuscular junction.

Nicotinolytic effect of atropine on the neuromuscular junction is discussed as a main mechanism of the beneficial effect of this drug during war and agriculture poisoning by anticholinesterases. Atropine is beneficial as it reduces the amplitude of intracellularly recorded endplate potentials and, first of all, causes a marked shortening of their time course (Beránek, Vyskočil 1968, Magazanik, Vyskočil 1969). Diazepam effectively blocks trains of action potentials in individual rat diaphragm muscle fibers, apparently by elevating the chloride permeability. It is suggested that similar increase in Cl<sup>-</sup> permeability may occur in brain excitable structures and can counteract the anticholinesterase-induced prolongation of ACh-depolarization that evokes repetitive firing.

*Keywords:* diazepam, atropine, anticholinesterase, endplate, muscle membrane

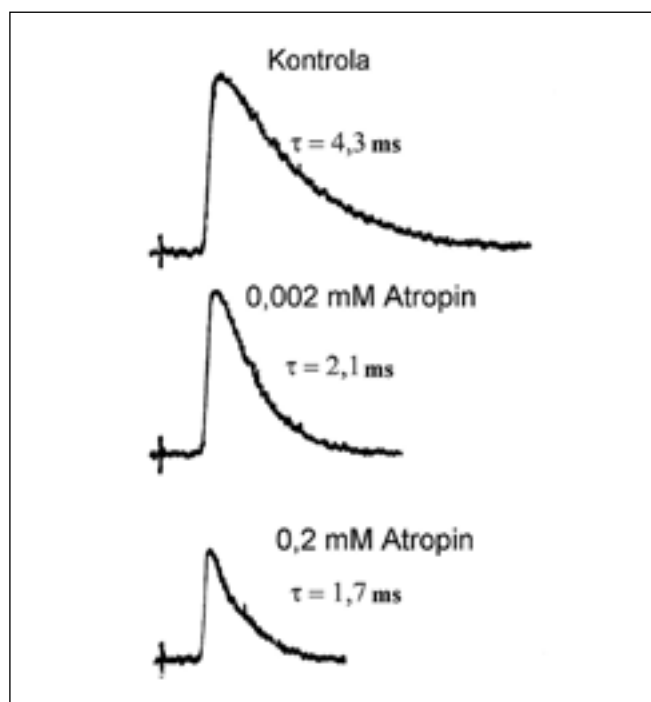
Nevím, odkdy mají vojáci ve své výbavě atropin a diazepam, ale já jsem je měl u sebe jeden podvečer na jaře r. 1977. Byl jsem v neděli na ústavu sám a frajersky pipetoval ústy alkoholický roztok  $1 \times 10^{-2}$  M paraoxonu. Do pipety vklouzly bublinky a zvedly roztok až na konec pipety a já nabyl přesvědčení, že jsem si zkontaminoval ústní sliznici. Po rychlém vymytí vodou se sodou jsem si uvědomil, že mi možná moc času nezbyvá. Do nemocnice jsem nemohl (porušení bezpečnosti práce by stálo několik lidí z ochranky a ředitelství perné chvíly), a tak na základě mých tehdejších

experimentálních znalostí jsem si dal do kapsy ampule atropinu a diazepam v očekávání cholinergní krize. Pak jsem vyzval telefonem ženu, aby šla se mnou na poslední společnou procházku jarním parkem, na což ona reagovala slovy, abych si spíš šel sám na pivo. Dobře to dopadlo (prošli jsme se parkem na pivo). A protože drkotání zubů strachem a podlamování kolen mezi příznaky cholinergní krize nepatří, atropinu a diazepamu bylo v mém případě netřeba. Tuto svou „předsmrtnou“ zkušenost uvádím v souvislosti s článkem L. Bartošové v Československé fyziologii 2/2006, str. 66,

kde se popisuje v rámci možná až příliš obsáhlé faktografie také farmakologická terapie bojových nervově-paralytických látek (NPL) právě atropinem a benzodiazepiny. Chtěl bych některé údaje především o účinku těchto látek doplnit a poukázat na několik našich prioritních prací z oné doby i na naprosto recentní nálezy, které umožňují pochopit, proč jsou atropin a diazepam používány při kompenzaci působení inhibitorů cholinesteráz.

Je jasné, že se v případě atropinu uplatňuje při ochraně synapse nejen muskarinolytické (pre- i postsynaptické) působení, jak uvádí L. Bartošová, ale i (a možná především) nikotinolytické působení atropinu [zkrácení působení acetylcholinu (ACh)]. V případě diazepamu ochrana spočívá v jiném mechanismu: omezení repetitivního vzniku akčních potenciálů na postsynaptické membráně a klonálních křečí svaloviny.

Proč NPL likvidují na cholinergní periferní synapsi přenos impulzů? Především proto, že inhibují synaptickou acetylcholinesterázu (AChE), a tak molekuly vyloučeného kvanta ACh mohou nejen opakovaně aktivovat tytéž subsynaptické nikotinové ACh receptory v záhybech přímo proti zónám výlevu, ale na své difúzní cestě ze synaptické štěrbině aktivovat stále nové postsynaptické receptory (tzv. postsynaptická potenciace). To vede k tomu, že se původně

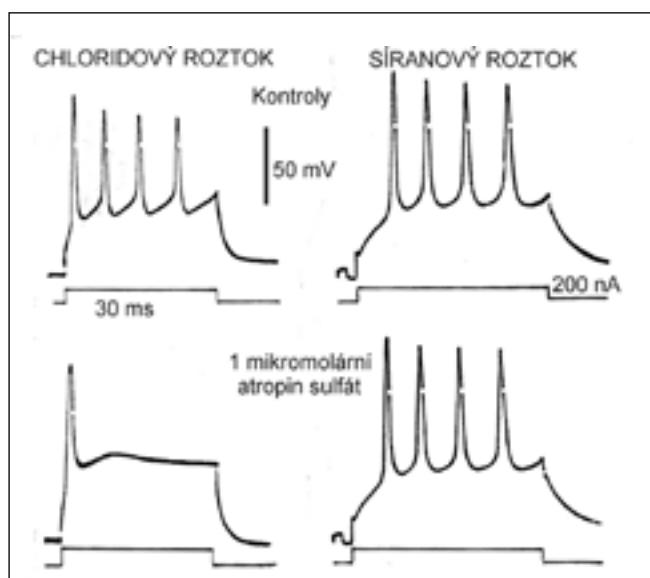


**Obr. 1:** Zkrácení časového průběhu cholinergní odpovědi působením atropinu (srov. Beránek, Vyskočil, 1968). Ploténkové potenciály prodloužené 30 min předlécením  $10^{-6}$  g/ml prostigminem byly snímány intracelulární skleněnou mikroelektrodou (zaplněnou 3M KCl, odpor 10 M $\Omega$ ) z ploténkové oblasti svalového vlákna bránice potkana *in vitro* před (Kontrola) a 20 min po aplikaci 0,002 nebo 0,2 mM atropin sulfátu do superfúzního roztoku. MgCl byl zvýšen na 10 mM, což sníží počet kvant a amplitudu ploténkového potenciálu pod práh pro akční potenciál.  $\tau$  exponenciálního poklesu (přímo úměrné době otevření nikotinového receptor-kanálu) se zmenšilo ze 4,3 ms na 1,7 ms, tj. došlo k 60 % zkrácení.

krátké, několikamilisekundové depolarizace, ploténkové potenciály, hrozivě prodlužují. Tato dlouhá depolarizace představuje jedno z rizik zahlcení zápoje. Druhá příčina prodloužení synaptické depolarizace spočívá v tom, že se při inhibici synaptické AChE (a to i jen částečně) dostává k receptorům a reaguje s nimi i ta frakce ACh, která se uvolňuje víceméně kontinuálně, nekvantově (Vyskočil, Illes, 1977; Vyskočil, 2003a,b). Tento proměnlivý, leč permanentní nekvantový únik z nervového zakončení představuje mnohem větší množství ACh (až desetkrát), než jsou kvanta z měchýřků, a proto také může podstatně přispět k desensitizaci receptorů, když ACh není rychle hydrolyzován synaptickou AChE. Desensitizace si v ničem nezadá třeba s kurarizací a pochopitelně při ní opět dochází k invalidizaci synapse (Vyskočil et al., 1983). Jinými slovy, anti-AChE zpočátku prodlužují při stejné postsynaptické citlivosti působení kvantového a nekvantového ACh a v druhé fázi uvádějí nAChR do desensitizovaného nefunkčního stavu.

Atropin jsme studovali na cholinergní synapsi v době, kdy jsme objevili různou citlivost „dospělých“ a „embryonálních“ (= denervačních) nikotinových ACh receptorů (nAChR) ke kurare (Beránek, Vyskočil, 1967, 1968), čímž byl dán impuls k srovnávací receptologii. Při několikanásobně vyšších koncentracích než kurare (řádově  $10^{-4}$  M), atropin vykazoval nikotinolytické působení na vazebná místa pro ACh a – na rozdíl od kurare – byl stejně účinný na dospělé i denervační nAChR. Co bylo ale nejvíce překvapující, ploténkové potenciály se po aplikaci atropinu zkrátily, a to ještě dříve, než se snížila jejich amplituda (obr. 1). Zkrácení časového průběhu jsme pak pozorovali i pod vlivem mnoha dalších derivátů atropinu vč. skopolaminu (metylatropin, tropacin, homatropin a dokonce kokain) (Magazanik, Vyskočil, 1969) a dnes už víme, že jde o důsledek blokády otevřeného iontového kanálu nAChR. Toto zkrácení v důsledku „open channel block“ je při otravě NPL pozitivním jevem, protože se kanály otevírají na kratší dobu a celková depolarizace na synapsi je kratší. Proto „výsadní postavení“ atropinu není jen důsledek muskarinového působení, ale i nikotinového. Kromě toho atropin také snižuje nekvantový výlev (Zemková, Vyskočil, Edwards, 1990) zřejmě přes M1 receptory a NO kaskádu (viz přehledy Vyskočil, 2002, 2003), a tedy snižuje i možnost desenzitizace nAChR, která je průvodním jevem otravy anticholinesterázami a NPL.

Ad benzodiazepiny (Capacio et al., 2001). Na obr. 2 jsou záznamy trainů akčních potenciálů (AP) svalového vlákna bránice potkana (podobné záznamy viz Vyskočil, 1977), které vznikají při dlouhodobější, 20 – 30 ms trvající depolarizaci druhou intracelulární elektrodou. To docela dobře imituje dlouhou depolarizaci ploténky a přechodnou fibrilaci vláken při otravě NPL. V tomto článku jsem napsal, že k opakovanému vzniku AP dochází díky hromadění  $K^+$  v transversálních tubulech či postsynaptických záhybech na ploténce, což vede k následné depolarizaci (která vzniká podle Nernstovy rovnice, když se snižuje rozdíl mezi intra- a extracelulární aktivitou  $K^+$ ) po ukončení jednoho AP a iniciaci dalšího. Poměrně vysoká chloridová permeabilita svalového vlákna ale působí proti nernstovské depolarizaci, snižuje příspěvek  $K^+$  permeability a stabilizuje membránu.



**Obr. 2:** Eliminace opakovaného vzniku akčních potenciálů diazepamem. Záznamy trainů akčních potenciálů svalového vlákna bránice potkana *in vitro* pomocí plovoucí intracelulární skleněné mikroelektrody, zaplněné 3M KCl, vyvolané 30 ms aplikací depolarizačního pulzu druhou mikroelektrodou (2M K citrát, odpor 5 MΩ, spodní záznamy pravoúhlého pulzu), zavedenou do téhož vlákna ve vzdálenosti 50 μm. Levé záznamy – chloridový fyziologický roztok, kde byl diazepam účinný při eliminaci opakované aktivity. Pravé záznamy získány v síranových solích. Teplota 22 °C.

Proto „samodepolarizace“ hromadícím se  $K^+$  ustává a okamžitě odeznívá po skončení depolarizačního pulzu. Přidání diazepamem v dávkách blízkých terapeutickým v normálním, tj. chloridy obsahujícím inkubačním roztoku úplně eliminovalo repetitivní aktivitu. To jsme vysvětlili GABA-independentním dalším zvýšením  $Cl^-$  propustnosti, protože náhrada chloridů sírany vedla k tomu, že diazepam nebyl schopen eliminovat repetitivní aktivitu (obr. 2, vpravo). V bezchloridových roztocích jsme pozorovali velmi snadný vznik svalových fibrilací po elektrickém či mechanickém podráždění, které se přenášely mezi vlákny; svaly tak vykazovaly vlastnosti „epileptické“ vzrušivé tkáně. Příčinou je zřejmě absence chloridové propustnosti, bez níž se svalové membrány chovají nernstovskovsky a reagují ideální depolarizací (s koeficientem 58–63 mV, podle teploty) na každé zvýšení extracelulárního draslíku při průchodu akčního potenciálu, což vede k opakovanému vzniku akčních potenciálů na tomtéž a sousedních vláknech.

Není žádný důvod se domnívat, že se tento účinek na chloridovou propustnost neuplatňuje také v c.n.s.; benzodiazepiny většinou dobře procházejí hematoencefalickou bariérou a zřejmě se jejich schopnost (původně popsána na svalu) zvyšovat  $Cl^-$  propustnost, ať již na GABA<sub>A</sub> receptorovém komplexu či na extrasynaptických membránách, projevuje

pozitivně i v c.n.s. Platí to nejen při otravě NPL, ale také při epileptických záchvatech, kdy benzodiazepiny bývají látkami první volby při akutním projevu nemoci, charakterizované opakovanými akčními potenciály u ložiskových neuronů, jejichž membránový potenciál je blízko prahu excitability (často v důsledku zvýšeného extracelulárního draslíku).

Když odhlédneme od anticholinesteráz jako bojových látek, jsou tyto látky používány dále jednak v chirurgické praxi a jako organofosfátové insekticidy. V globálním měřítku přináší bohužel smrt nesrovnatelně většímu množství osob, než kdy způsobily NPL. Podle posledních údajů ročně umírají stovky tisíc lidí na anticholinesterázové účinky těchto preparátů (Jeyaratnam, 1990; Eddleston et al., 2005), a proto se hledají látky s více specifickým účinkem, které by nevedly při běžné kontaminaci k fatálním následkům. Výsledek jednoho takového pokusu s derivátem 6-methyluracilu (1,3-bis[5(dietyl-o-nitrobenzylammonio)pentyl]-6-methyluracil) (laboratorní kód C-547) jsme publikovali tento rok v *Physiol. Res.* (Petrov et al., 2006). Anticholinesterázové působení C-547, ověřené předem biochemicky, jsme funkčně testovali *in vitro* jako zvýšení a prodloužení miniaturních ploténkových proudů (MEPC) na synapsích tří modelových svalů potkana: dvou končetinových (soleus a extensor digitorum longus) a hlavního dýchacího svalu diafragmy. Překvapivě se ukázalo, že při aplikaci C-547 byly nejprve zvýšeny a prodlouženy MEPC u soleu a EDL v nanomolárních koncentracích ( $5 \cdot 10^{-9}$  M), kdežto ke srovnatelnému zvýšení u bránice došlo až při koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$  M. Tomuto výraznému rozdílu v citlivosti AChE mezi svaly k této látce odpovídaly i experimenty na běhacím turniket, kde se prokázalo oslabení výkonu a výsledná imobilita končetin v dávkách  $50 \times$  menších, než byla LD<sub>50</sub> v důsledku selhání dýchacích svalů. Tento zajímavý rozdíl v citlivosti je mnohem větší, než v případě jiných běžných anticholinesteráz, většinou patřících mezi organofosfátové inhibitory, karbamáty a oniové soli. Příčinu rozdílu zatím neznáme, ale nejde o interferenci s butyrylcholinesterázou, protože efekt je stejný po její inhibici iso-OMPA. S největší pravděpodobností v různých typech svalových plotének existují isoformy AChE, které mají různou citlivost k tomuto inhibitoru (Grisaru et al., 1999) a jejich poměrné zastoupení určuje citlivost k C-547. Až budeme lépe znát cholinesterázovou výbavu jednotlivých typů svalových vláken, bude možné vyhledávat či přímo konstruovat nové šetrné anticholinesterázy s vysokým bezpečnostním koeficientem pro terapii a rostlinné pěstitelství.

prof. RNDr. Vyskočil František, DrSc.,  
Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky,  
Václavská 1083, Praha  
a Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie,  
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova,  
Viničná 7, Praha 2, Česká republika,  
E-mail: vyskocil@biomed.cas.cz

## LITERATURA

---

1. Bartošová L. Otravy nervově paralytickými látkami: co o nich víme? *Československá fyziologie* 2/2006, s.66-75.
2. Beránek R, Vyskočil F. The action of tubocurarine and atropine on the normal and denervated rat diaphragm. *J Physiol*, 188, 1967, s. 53-66 .
3. Beránek R, Vyskočil F. The effect of atropine on the frog sartorius neuromuscular junction. *J Physiol* 195, 1968, s. 493-503.
4. Capacio BR et al. Intramuscular Diazepam Pharmacokinetics in Soman-exposed Guinea Pigs. *J Appl Toxicol* 21, 2001, s. S67-S74.
5. Eddleston M, Singh S, Buckley N. Organophosphorus poisoning (acute). *Clin Evid* 13, 2005, s. 1744-1755.
6. Grisar D et al. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem*. 1999, 264. s. 672-686.
7. Jeyaratnam J Acute pesticide poisoning: a major global health problem. *World Health Statistics Quarterly. Rapport Trimestriel De Statistiques Sanitaires Mondiales* 43, Issue 3 , 1990, s. 139-144.
8. Magazanik LG, Vyskočil F. Different action of atropine and some analogues on the end-plate potentials and induced acetylcholine potentials. *Experientia* 25, 1969, s. 618-619.
9. Petrov KA, Kovyazina IV, Vyskočil F et al. Different Sensitivity of Miniature Endplate Currents of the Rat Extensor Digitorum Longus, Soleus and Diaphragm Muscles to a Novel Acetylcholinesterase Inhibitor C-547. *Physiol Res* 56, 2006, v tisku.
10. Vyskočil F. Diazepam blockade of repetitive action potentials in skeletal muscle fibres. A model of its membrane action. *Brain Res*, 133, 1977 s. 315-328.
11. Vyskočil F. Časná postdenervační depolarizace: vliv NO, acetylcholinu a glutamátu na chloridový transportér. *Českoslov fysiolog* 51, 2002, s. 147-158.
12. Vyskočil F. Early postdenervation depolarization is controlled by acetylcholine and glutamate via nitric oxide regulation of the chloride transporter. *Neurochem Res* 28, 2003, s. 575-585.
13. Vyskočil F, Illes P. Non-quantal release of transmitter at mouse neuromuscular junction and its dependence on the activity of Na-K-ATPase. *Pfluegers Arch* 370, 1977, p. 295-297.
14. Vyskočil F, Nikolsky EE, Edwards C. An analysis of the mechanisms underlying the non-quantal release of acetylcholine at the mouse neuromuscular junction. *J Neurosci* 9, 1983, p. 429-435.
15. Zemková H, Vyskočil F, Edwards C. The effects of nerve terminal activity on non-quantal release of acetylcholine at the mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 423, 1990, p. 631-640.