

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

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Reaktivierung Insektizid-gehemmter humaner
Acetylcholinesterase durch eine Kombination der Oxime
Obidoxim und HI-6 – eine kinetische in-vitro-Studie

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

vorgelegt von

Adrian Georg Loher

aus
München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Franz Worek

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. vet. Elmar Richter

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Timo Wille

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2020



DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Franz Worek, meinem Doktorvater, ganz besonders für die ausgezeichnete Betreuung, die Themenauswahl, die vielen zielführenden Anregungen, sowie die methodische und die wissenschaftliche Unterstützung danken.

Mein herzlichster Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Horst Thiermann, Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, für die Möglichkeit, diese experimentelle Doktorarbeit an seinem Institut unter optimalen Laborbedingungen anfertigen zu können.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgemeinschaft Worek möchte ich mich herzlichst für das angenehme Miteinander und die kollegiale Zusammenarbeit bei der praktischen Durchführung der Versuche bedanken.

Meiner Familie und meiner Freundin Magdalena in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Entwicklung von organischen Phosphorverbindungen	1
1.2 Entwicklung von Insektiziden	3
1.3 Vergiftungen mit Organophosphaten	4
1.4 Versuch der Regulierung von Organophosphaten	5
1.5 Wirkung von Organophosphaten	6
1.6 Symptome der akuten Organophosphatvergiftung	8
1.7 Therapie von Organophosphatvergiftungen	10
1.8 Kombinationstherapie von HI-6 und Obidoxim.....	10
1.9 Eingesetzte Insektizide und deren Struktur	12
1.10 Zielsetzung	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. Material	17
2.1.1 Substanzen	17
2.1.1.1 Allgemein verwendete Substanzen.....	17
2.1.1.2 Substanzen zur Herstellung der 0,1 M Phosphatpufferlösung (pH 7.4)	19
2.1.1.3 Substanzen zur Herstellung der hypo-osmolaren Phosphatpufferlösung.....	19
2.1.2 Geräte und Labormaterialien.....	19
2.1.2.1 Allgemeine Geräte und Labormaterialien.....	19
2.1.2.2 Pufferlösungen	20
2.1.3 Reagenzien	21
2.1.3.1 Herstellung von 10 mM 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoësäure (DTNB)-Lösung....	21
2.1.3.2 Herstellung von 28,4 mM Acetylthiocholin Iodid (= ASCh)-Lösung	21
2.1.3.3 Herstellung der Obidoxim-Stammlösung (200 mM).....	22
2.1.3.4 Herstellung der HI-6-Stammlösung (200 mM).....	22
2.1.3.5 Herstellung von Organophosphat-Stammlösungen	23
2.1.4 Enzympräparate.....	23
2.1.5 Firmenregister.....	24
2.2 METHODEN.....	26
2.2.1 Grundlagen der Photometrie.....	26
2.2.2 Ellmann Essay.....	27
2.2.2.1 Grundlagen.....	27
2.2.2.2 Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität	28
2.2.3 Vorbereitung inhibierter Acetylcholinesterase	31

2.2.4 Reaktivierung Organophosphat-gehemmter Acetylcholinesterase	32
2.2.5 Bestimmung der Reaktivierungskonstanten.....	32
2.2.5.1 Bestimmung von k_{obs}	33
2.2.5.2 Bestimmung von K_D und k_r	33
2.2.5.3 Bestimmung von k_{r2}	34
2.2.6 Reaktivierung von Organophosphat-gehemmten Proben mit Obidoxim, HI-6 und deren Kombination	34
2.2.7 Hemmung der Acetylcholinesterase durch verwendete Oxime.....	36
3. ERGEBNISSE	37
3.1 Reaktivierung Diethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase.....	37
3.1.1 Reaktivierung PXE-gehemmter Acetylcholinesterase	37
3.1.2 Reaktivierung CPO-gehemmter Acetylcholinesterase.....	40
3.2 Reaktivierung Dimethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase	43
3.2.1 Reaktivierung PXM-gehemmter Acetylcholinesterase	43
3.2.2 Reaktivierung Omethoat-gehemmter Acetylcholinesterase.....	47
3.2.3 Reaktivierung Pirimiphos-methyl-oxon-gehemmter Acetylcholinesterase	49
3.3 Reaktivierung weiterer OP-gehemmter Acetylcholinesterase.....	51
3.3.1 Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase.....	51
3.3.2 Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase	54
3.4 Bestimmung der Reaktivierungskonstante k_{obs}	55
3.4.1 Bestimmung von k_{obs} am Beispiel der Reaktivierung unverdünnter PXE-gehemmter humaner Acetylcholinesterase	56
3.4.2 Bestimmung weiterer k_{obs} -Werte	57
3.5 Bestimmung übergeordneter Reaktivierungskonstanten am Beispiel von Ethoprophos	60
3.5.1 Nicht-lineare Regression: Reaktivierung von Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase mit Obidoxim und HI-6	60
3.5.2 Lineare Regression: Reaktivierung von Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase mit Obidoxim und HI-6	61
3.5.3 Bestimmung von k_r , K_D und k_{r2}	62
3.6 Hemmung der Acetylcholinesterase durch verwendete Oxime	63
4. DISKUSSION	64
4.1 Reaktivierung Diethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase.....	64
4.2 Reaktivierung Dimethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase	66
4.3 Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase	68

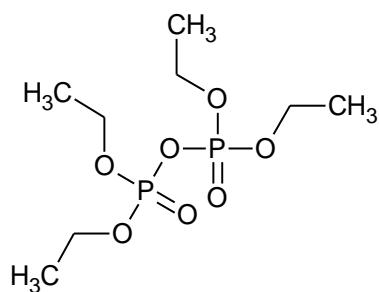
4.4 Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase	69
4.5 Vergleich von k_{obs} -Werten	70
4.6 POX-Effekt.....	70
4.7 Vergleich der Kombinationstherapie mit der Obidoximeinzeltherapie	71
4.8 Vergleich unterschiedlicher Oximkonzentrationen.....	72
4.9 Bestimmung übergeordneter Reaktivierungskonstanten am Beispiel von Ethoprophos	73
4.10 Limitationen und Ausblick	74
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	77
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	80
7. TABELLENVERZEICHNIS	83
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	84
9. LITERATURVERZEICHNIS	86
10. ANHANG	99

1. EINLEITUNG

1.1 Entwicklung von organischen Phosphorverbindungen

In jüngster Vergangenheit hat die mutmaßliche Ermordung des Nordkoreaners Kim Jong-Nam – Halbbruder des sogenannten *Obersten Führers* Nordkoreas Kim Jong-Un – für Aufsehen gesorgt. Der Vorfall ereignete sich im Februar 2017 im Flughafen von Kuala Lumpur. Zwei Frauen sollen ihm zuvor eine zum Zeitpunkt des Vorfalls unbekannte Substanz über das Gesicht geschüttet haben. Wenige Zeit später verstarb Kim Jong-Nam. Eine Gewebeprobe des Leichnams von Gesicht und Augen lieferte den Nachweis der Substanz *S-[2-(Diisopropylamino)ethyl]-O-ethyl-methylphosphonothioat*, besser bekannt unter dem Namen VX (Chai et al. 2017).

VX zählt zu den Nervengiften und gilt als eine der bekanntesten Substanzen aus der Gruppe der sog. Organophosphate. Als Vorreiter-Substanz für die Gruppe der phosphororganischen Verbindungen (Organophosphate; OP) gilt Tetraethylpyrophosphat (TEPP; siehe Abbildung 1). Dieses wurde Mitte des 19. Jahrhunderts durch Wladimir Petrovich Moshnin entdeckt (Petroianu 2015). Aufbauend auf Moshnins Entdeckung, gelang auch Philippe de Clermont die Synthese von TEPP, welcher diese zum ersten Mal schriftlich festhielt (de Clermont 1854).



**Tetraethylpyrophosphat
(TEPP)**

Abb. 1. Strukturformel von TEPP

Wesentliche Beiträge zur Entwicklung von organischen Phosphorverbindungen lieferten weiterhin August Michaelis (Michaelis 1903) und Alexander Arbusow (Arbusow 1906). Ihre große Bedeutung erlangten die Organophosphat-Verbindungen allerdings erst ab 1936 mit

der Entdeckung von Tabun (1936) und Sarin (1939) durch Gerhard Schrader im Rahmen seiner Forschung zur Entwicklung wirksamer Pflanzenschutzmittel (Schrader 1951). Schrader entdeckte zahlreiche Insektizide, die auf Organophosphor-Verbindungen basieren. Unter anderem die Substanzen Parathion (E605) und Paraoxon (E600), welche in Deutschland bis in das Jahr 2002 (siehe Anhang 1 der Richtlinie 91/414/EWG) verwendet werden durften. Während auf der einen Seite weitere Insektizide auf der Grundlage von Organophosphaten entstanden, wurde das gefährliche Potential ebendieser Verbindungen auch für den militärischen Bereich erkannt. So entstanden die sogenannten Nervenkampfstoffe. Richard Kuhn und Konrad Henkel entwickelten 1944 das Nervengift Soman (Schmaltz 2005). Tabun (GA), Sarin (GB) sowie Soman (GD) zählen zu den sogenannten „G-Stoffen“ (siehe Abbildung 2). Das „G“ bezieht sich darauf, dass diese alle ihren Ursprung in Deutschland (engl. german = deutsch) haben (Sidell et al. 2008).

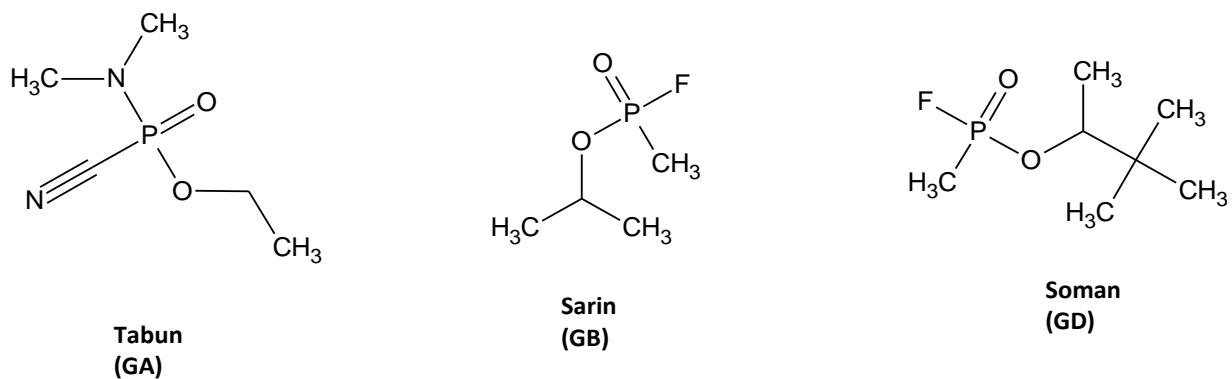


Abb. 2. Strukturformeln der G-Stoffe Tabun, Sarin und Gabun

Wie bereits Gerhard Schrader erkannte, ist allen organischen Phosphorverbindungen eine Grundformel gemein (siehe Abbildung 3).



Abb. 3. Schradersche Acylformel

R₁ und R₂ stellen kurzkettige Alkyl-, Alkoxy-, Alkylthio- oder Aminogruppen und X eine leicht abspaltbare Gruppe, z. B. eine Halogen-, Cyanid-, Phenoxy- oder Thiol-Gruppe dar.

1954 wurde bei Forschungen zur Entwicklung weiterer Pflanzenschutzmittel in Großbritannien erstmals die Substanz Amiton (VG) hergestellt (Robinson 1971). VG gilt als erster Stoff der „V-Reihe“ (siehe Abbildung 4). Der Name leitet sich von *victory* ab, dem englischen Wort für Sieg. Für militärische Zwecke wurden daraus VX und VR entwickelt. VX wurde vor allem in den USA und VR in Russland produziert. Die V-Stoffe gelten als weitaus giftiger und stabiler als die G-Stoffe (Moshiri et al. 2012).

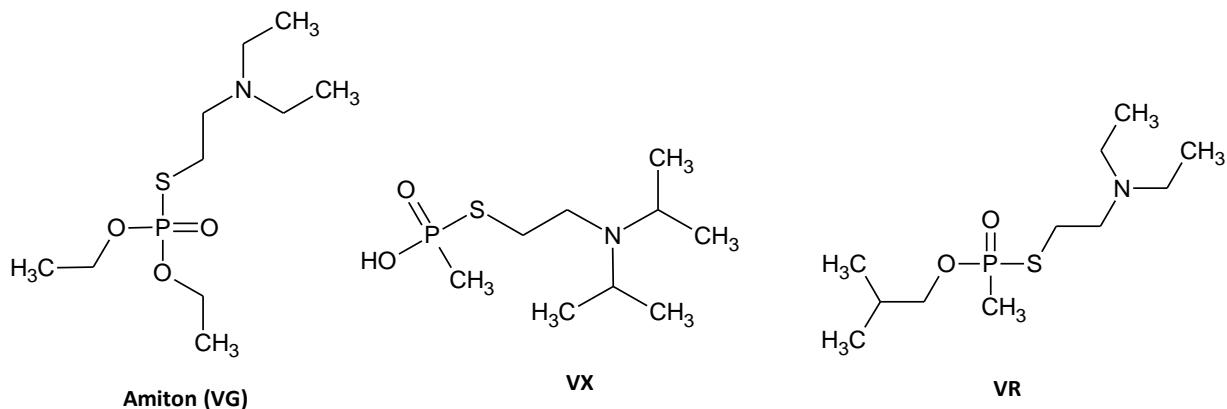


Abb. 4. Strukturformeln der V-Stoffe VG, VX und VR

1.2 Entwicklung von Insektiziden

„Da sprach der Herr zu Mose: Recke deine Hand über Ägyptenland, dass Heuschrecken auf Ägyptenland kommen und alles auffressen, was im Lande wächst, alles, was der Hagel übriggelassen hat.“ (2 Mos, 10,12, zitiert nach Luther 1867, S.52)

Wie bereits aus dem 2. Buch Mose des Alten Testaments zu erkennen ist, sind Ernteeinbußen aufgrund von Schädlingen bereits seit jeher ein Problem des Menschen. Um solche Einbußen möglichst gering zu halten, wurden im Laufe der Zeit unterschiedliche Mittel entwickelt, die in der Entdeckung von Organophosphaten zur Schädlingsbekämpfung gipfelten.

Bereits zu Zeiten der alten Griechen und der Römer verwendete man Schwefel und Arsen, um sich vor Schädlingen zu schützen (Hasall 1990). Das erste synthetisierte Insektizid namens *Antinonnin* wurde bereits 1892 von der Firma Bayer veröffentlicht (Hayes und Laws 1991). Wie bereits oben erwähnt, gingen aus der Forschung Gerhard Schraders zu möglichen Pflanzenschutzmitteln für die I.G. Farben ab 1936 die Substanzen Parathion (E605) und

Paraoxon (E600) als Vertreter aus der Gruppe der Organophosphate hervor. Mehrere Jahrzehnte zuvor wurde mit Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) bereits eine organische Chlorverbindung durch Othmar Zeidler synthetisiert (Zeidler 1874), deren Wirkung als Insektizid allerdings erst durch den Schweizer Wissenschaftler Paul Hermann Müller 1939 erkannt wurde (Simon 1999). Ab den 50er-Jahren kam schließlich die Gruppe der Carbamate hinzu. Im Laufe der Zeit stellte man fest, dass sich die organischen Chlorverbindungen in der Nahrungskette anreicherten, weshalb sie ab den 70er Jahren verboten wurden (Dittmeyer et al. 2005). Im Gegensatz dazu wiesen die Organophosphat-Insektizide eine wesentlich geringere Umweltstabilität auf, weshalb sie auch heute noch – vor allem in Entwicklungsländern – zum Einsatz kommen (Casida und Durkin 2013).

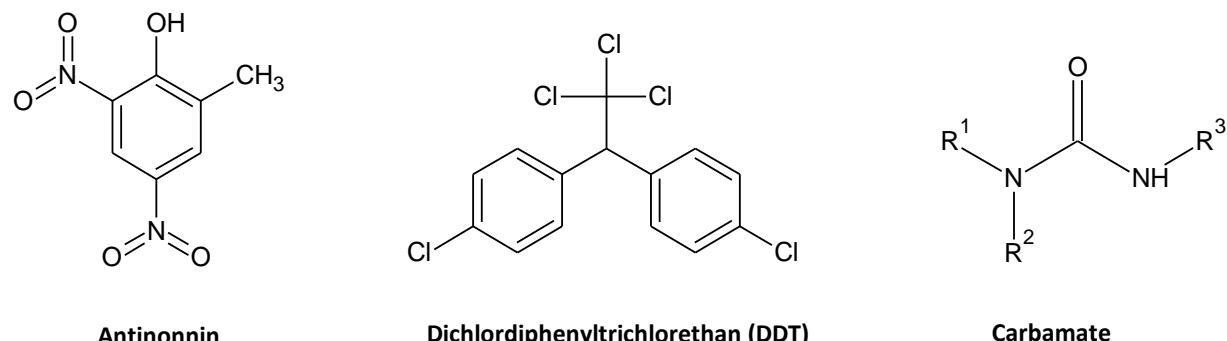


Abb. 5. Strukturformeln verschiedener Insektizide

1.3 Vergiftungen mit Organophosphaten

Absichtliche Vergiftungen mit Organophosphat-Pestiziden gelten vor allem in ländlichen Regionen Asiens als ein großes Problem. Schätzungen zufolge verursachen Intoxikationen mit OP-Insektiziden in suizidaler Absicht rund 200.000 Todesfälle pro Jahr. Todesfälle infolge unabsichtlicher Vergiftungen mit OP-Insektiziden sind weitaus seltener und scheinen vor allem in Gebieten aufzutreten, in welchen hochtoxische OP-Insektizide verfügbar sind (Eddleston et al. 2008).

Weiterhin spielten OP-Intoxikationen während militärischer Auseinandersetzungen und im Rahmen terroristischer Attacken in der Vergangenheit eine bedeutende Rolle. Unter anderem im Verlaufe des irakisch-iranischen Krieges wurden Nervenkampfstoffe herangezogen (Macilwain 1993). Während des Giftgasangriffs auf Halabdscha am 16. März 1988 setzte das irakische Militär derartige Stoffe gegenüber kurdischen Zivilisten ein

(Mohamed-Ali 1992). Bei terroristischen Giftgasattacken in den japanischen Städten Matsumoto (1994) und in Tokio (1995) kamen durch den Einsatz von Nervenkampfstoffen 19 Menschen ums Leben, über 6000 wurden verletzt (Yanagisawa et al. 2006). In jüngster Vergangenheit ist der Nervenkampfstoff Sarin durch dessen mehrfache Anwendung im syrischen Bürgerkrieg in die Schlagzeilen geraten. Der wohl bekannteste Einsatz von Nervenkampfstoffen während des Bürgerkrieges fand am 21. August 2013 bei den Giftgasangriffen von Ghuta statt, bei dem bis zu 1500 Menschen ihr Leben verloren und mehrere tausend vergiftet wurden (Pita und Domingo 2014).

1.4 Versuch der Regulierung von Organophosphaten

Bereits nach dem 1. Weltkrieg versuchte man durch das *Genfer Protokoll* von 1925 den Gebrauch von chemischen und biologischen Waffen zu unterbinden. Nicht Teil des Protokolls war allerdings der Umgang mit deren Entwicklung, Herstellung und Lagerung (Schindler und Toman 1988).

Nach dem 2. Weltkrieg entstanden in den USA und der Sowjetunion große Vorräte von Nervenkampfstoffen (Szinicz 2005). Derartige Vorräte und die zunehmende Gefahr der Verwendung von Organophosphaten bei terroristischen Attentaten stellen eine enorme Bedrohung für die Weltbevölkerung dar und führten zu dem 1993 beschlossenen und am 29. April 1997 in Kraft getretenen *Chemiewaffenübereinkommen* (CWÜ). Dieses verbietet die Entwicklung, Lagerung, Herstellung und den Besitz chemischer Waffen und regelt die Vernichtung solcher. Für die Durchsetzung des CWÜ wurde eigens die *Organisation für das Verbot chemischer Waffen* (OPCW) mit Sitz in Den Haag gegründet. Aktuell sind mehr als 97% aller Staaten der Erde Unterzeichner dieses Abkommens (Worek et al. 2016a).

Um auf der Ebene der OP-Insektizide für eine Regulierung und Gefahrenabschätzung zu sorgen und somit die Anzahl von Fällen absichtlicher sowie unabsichtlicher Vergiftungen zu reduzieren, hat die WHO folgendes Schema eingeführt (World Health Organization 2010):

Tabelle 1**WHO-Schema zur Klassifizierung von Pestiziden nach Gefahr**

WHO Klasse		<u>LD₅₀ bei Ratten (mg/kg Körpergewicht)</u>	
		Oral	Dermal
Ia	Äußerst gefährlich	< 5	< 50
Ib	Sehr gefährlich	5–50	50–200
II	Mäßig gefährlich	50–2000	200–2000
III	Leicht gefährlich	Über 2000	Über 2000
U	Akute Gefahr unwahrscheinlich	5000 oder höher	

In vielen Ländern sind Stoffe der Klasse I nach WHO inzwischen verboten (Bertolote et al. 2006). Die konkrete Einordnung einzelner Stoffe in die jeweilige Klasse ist der WHO-Klassifikation zu entnehmen. Neueste Studien deuten darauf hin, dass durch derartige Verbote ein deutlicher Rückgang an Todesfällen und in der Krankenhaussterblichkeit zu verzeichnen ist (Chowdhury et al. 2018; Knipe et al. 2017).

1.5 Wirkung von Organophosphaten

Bei Raumtemperatur sind Organophosphate flüssig und unterscheiden sich in ihrer variablen Flüchtigkeit voneinander. Die Inkorporation erfolgt insbesondere über die Haut, die Augen, das Magen-Darm- sowie das Atemsystem (Ellison 2008). Ihr wesentlicher Wirkmechanismus ist die irreversible Hemmung der Acetylcholinesterase durch Phosphorylierung (= Phosphorylierung und Phosphylierung) einer OH-Gruppe am Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms (Aldridge und Reiner 1972). Das jeweilige Organophosphat bildet dabei mit dem Enzym zunächst einen Komplex, ehe die Abgangsgruppe abgespalten wird und das phosphorylierte, inaktive Enzym verbleibt. Das gehemmte Enzym hat nun mehrere Möglichkeiten von Folgereaktionen (siehe Abbildung 6). Durch spontane Hydrolyse kann das Enzym in seiner aktiven Form wiederhergestellt werden (= Spontanreaktivierung). Die Spontanreaktivierung ist abhängig von der Struktur der jeweiligen Substanz. Bei G-Stoffen z.B.

findet keine nennenswerte Spontanreaktivierung statt. Dimethyl-Pestizide dagegen werden wesentlich schneller reaktiviert als Diethyl-Pestizide. Weiterhin besteht die Möglichkeit der spontanen Dealkylierung (= Alterung). Es kommt zur Stabilisierung des phosphorylierten Enzyms und damit zu deren irreversiblen Inaktivierung. Auch die Geschwindigkeit der Alterung ist von Substanz zu Substanz unterschiedlich. So unterliegt Soman-gehemmte Acetylcholinesterase einer äußert schnellen Alterung ($t_{1/2} \sim 2$ min), das durch Diethyl-Pestizide gehemmte Enzym dagegen einer sehr langsamen Alterung ($t_{1/2} \sim 30$ h; Worek et al. 2004). Auch durch Oxime, stark nukleophile Substanzen mit einer funktionellen C=N-OH-Gruppe, kann eine Reaktivierung der Acetylcholinesterase erreicht werden. Dies geschieht durch die Übertragung des Phosphyl-Restes von einem Enzym auf das Oxim. Das phosphorylierte Oxim (POX) wiederum ist potentiell ein potenter Reinhinhibitior von Cholinesterasen (Ashani et al. 2003).

Neben der Acetylcholinesterase sind auch andere Esterasen, wie z. B. die Butyrylcholinesterase und die Carboxylesterase, Angriffspunkte für Organophosphate. Diese Enzyme macht man sich als sogenannte Bioscavenger, d. h. Substanzen, die Gifte abfangen und inaktivieren bevor diese ihre Wirkung entfalten können, zu Nutze (Goldsmith und Ashani 2018).

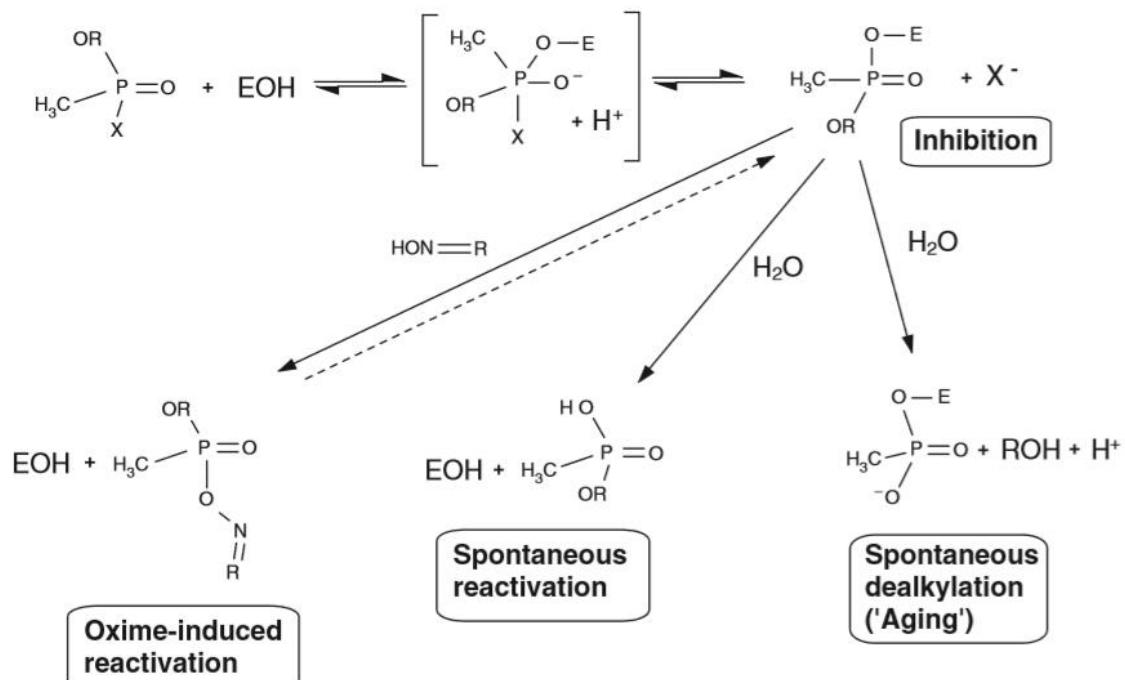


Abb. 6. Hemmung der Acetylcholinesterase durch Organophosphate und mögliche Folgereaktionen (Worek et Thiermann 2013)

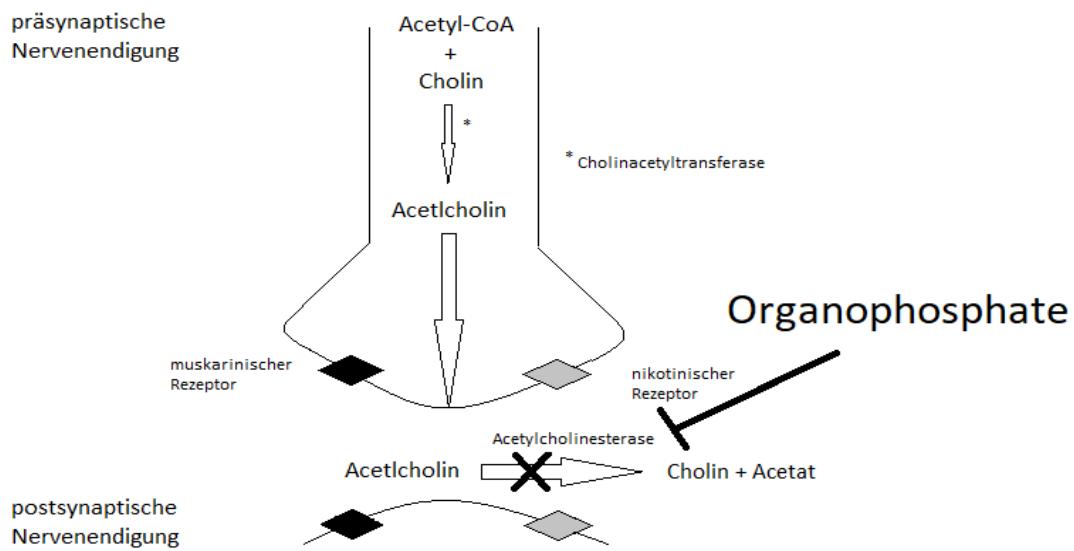


Abb. 7. Wirkung von Organophosphaten an synaptischen Enden

Durch die Hemmung der Acetylcholinesterase kann sie Acetylcholin nicht mehr zu Cholin und Acetat abbauen. Es reichert sich Acetylcholin an (siehe Abbildung 7). Dies führt zu Überstimulation von Acetylcholinrezeptoren an Synapsen des zentralen und autonomen Nervensystems sowie an der motorischen Endplatte (Lotti 2001).

1.6 Symptome der akuten Organophosphatvergiftung

Die Symptome einer Vergiftung mit Organophosphaten ergeben sich aus einer Dauerregung des jeweiligen Rezeptortyps bzw. betroffenen Nervensystems und sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Symptome der akuten Vergiftung mit Organophosphaten (angelehnt an Eddleston et al. 2008)

Betroffenes System			
	Vegetatives Nervensystem	Zentrales Nervensystem	Motorische Endplatte
Sympathisch (nikotinischer Rezeptor)	Parasympathisch (muskarinischer Rezeptor)		
Symptome	<ul style="list-style-type: none"> - Tachykardie - Bluthochdruck - Schwitzen 	<ul style="list-style-type: none"> - Bronchorrhoe - Bronchospasmus - Miosis - Tränenfluss - Urinieren - Diarröhе - Blutdruckabfall - Bradykardie - Übelkeit - Erbrechen - Speichelfluss 	<ul style="list-style-type: none"> - Verwirrtheit - Unruhe - Koma - Atemdepression - Krämpfe
			<ul style="list-style-type: none"> - muskuläre Schwäche - Paralyse - Faszikulationen

Anzeichen einer leichten Vergiftung können Miosis, Tränen- und Speichelfluss sowie Übelkeit sein. Bei einer moderaten Vergiftung können zusätzlich Symptome wie Erbrechen, Defäkation und Urinieren, Bradykardie sowie Atemprobleme hinzukommen. Symptome einer schwerwiegenden Vergiftung reichen von einem Kreislaufkollaps, über Atemstillstand und Koma bis hin zum Tod (Worek et al. 2016a). Obwohl der Wirkmechanismus bei allen Organophosphaten dem Prinzip nach gleich ist, ist das Überleben und die Symptomatik abhängig von Faktoren wie etwa Unterschieden in Inkorporationsweg, Potenz, Lipidlöslichkeit und Flüchtigkeit des jeweiligen Organophosphates (Peter et al. 2014).

1.7 Therapie von Organophosphatvergiftungen

Die aktuelle Standardtherapie bei Vergiftungen mit Organophosphaten besteht in der Gabe von Atropin und einem Oxim (Peter et al. 2007). Weiterhin werden Antikonvulsiva wie etwa Diazepam verabreicht, um epileptische Anfälle zu unterbrechen und somit mögliche Folgeschäden im Gehirn zu verhindern (Bajgar 2004). Atropin ist ein kompetitiver Antagonist am muskarinischen Rezeptor und wirkt somit einer Überstimulation durch Acetylcholinüberschuss entgegen. Da Atropin mit dem muskarinischen Rezeptortyp interagiert, können lediglich OP-Auswirkungen auf die glatte Muskulatur, Drüsen, Herz und ZNS antagonisiert werden. Der Einsatz von Atropin stellt somit einen rein symptomatischen Therapieansatz dar (Thiermann et al. 2011).

Um zusätzlich den Symptomen einer OP-Vergiftung entgegenzuwirken, welche durch Überstimulation nikotinischer Rezeptoren vor allem im Bereich der motorischen Endplatte entstehen, ist es notwendig, die Funktion der Acetylcholinesterase mittels eines Oxims wiederherzustellen (Newmark 2004).

1.8 Kombinationstherapie von HI-6 und Obidoxim

In den 1950er und 1960er-Jahren entstanden die ersten, auch heute noch therapeutisch eingesetzten Oxime (siehe Abbildung 8), wie Obidoxim und Pralidoxim (Namba und Hiraki 1958; Erdmann 1968). Es stellte sich jedoch heraus, dass diese gegen Nervenkampfstoffe wie z. B. Soman kaum wirksam waren, weshalb zahlreiche weitere Oxime entwickelt wurden. Die Arbeitsgruppe von Frau Professor Hagedorn entwickelte daraufhin die sogenannten *H-Oxime*, wie z. B. HI-6 (siehe Abbildung 8), welche sich als wirksame Reaktivatoren der durch verschiedene Nervenkampfstoffe wie z. B. Cyclosarin gehemmten Acetylcholinesterase erwiesen (Worek et al. 2007a). Während sich Obidoxim als wirksam gegenüber Vergiftungen mit OP-Pestiziden erwies (Erdmann und Clarmann 1963), stellt sich HI-6 als schwacher Reaktivator von zahlreichen OP-Pestiziden dar (Worek et al. 1999a). Keines der derzeit gängigen Oxime (Pralidoxim, Obidoxim und HI-6) zeigt eine ausreichende Wirkung gegenüber einer größeren Bandbreite von verschiedenen Organophosphaten (Worek und Thiermann 2013). Um die Lücken im Wirkspektrum der einzelnen Oxime zu füllen oder sogar etwaige additive Wirksamkeitseffekte zu erhalten, könnte es sinnvoll sein, zwei Oxime mit sich

ergänzenden Wirkspektren zu kombinieren. Die Kombination von HI-6 und Obidoxim stellt dabei einen möglicherweise vielversprechenden Ansatz dar.

Bereits Clement kombinierte 1987 diese beiden Stoffe zusammen mit Atropin an Soman- und Tabun-vergifteten Labormäusen und stellte fest, dass sich die Kombination subtherapeutischer Einzeldosen gegenüber der jeweiligen Einzeldosis positiv auf die Behandlung auswirkte (Tabun) oder zumindest die Einzelwirkung von HI-6 durch Obidoximzugabe (Soman) nicht minderte (Clement et al. 1987). Weiterhin befasste sich auch Maksimovic bereits Ende der 80er Jahre mit einer derartigen Kombinationstherapie und erprobte diese an Ratten und Meerschweinchen (Maksimovic et al. 1987; Maksimovic et al. 1989). Worek testete die Reaktivierungsfähigkeit dieser Kombination das erste Mal unter in-vitro-Bedingungen an menschlicher Acetylcholinesterase, die durch Sarin, Cyclosarin, VX, Tabun oder Paraoxon gehemmt wurde. Er stellte fest, dass eine Kombinationstherapie die Reaktivierungsleistung im Vergleich zur Einzelverabreichung von HI-6 oder Obidoxim nicht beeinflusst, allerdings durch die Kombination das effektive Wirkpektrum erweitert werden kann. Worek schlägt demzufolge eine mögliche Kombination in Autoinjektoren vor, welche bislang lediglich ein Oxim enthalten. Dies spielt vor allem dann eine Rolle, wenn das Organophosphat bei Vergiftungen nicht bekannt ist (Worek et al. 2007a). Kassa untersuchte die Kombinationstherapie an Tabun-vergifteten Ratten und Mäusen. Er schlussfolgerte, dass die Reaktivierungsleistung der Kombinationstherapie bei Tabun-gehemmter Acetylcholinesterase besser als diejenige einer Oximeinfachgabe bei Ratten ist und akute Vergiftungssymptome gemindert werden können (Kassa et al. 2010). In einer weiteren Studie testete Kassa die Kombinationen aus HI-6 mit Trimedoxim oder K203 an Ratten, die mit einer subletal Dosis von Soman vergiftet wurden. Die Kombinationen konnten dabei im Vergleich zur Einzelgabe akute Vergiftungssymptome eher mindern (Kassa et al. 2011). Zu ähnlichen Ergebnissen kam Kassa bei Sarin-vergifteten Ratten, wenngleich auch der Vorteil der Kombinationstherapie nur gering ausfiel (Kassa und Kunesova 2012). In seiner aktuellsten Studie untersuchte Kassa die Effektivität einer Kombinationstherapie aus HI-6 und Trimedoxim oder K203 an Sarin-vergifteten Ratten in Bezug auf Überleben und Gehirnschäden. Es zeigte sich, dass die neuroprotektive Wirksamkeit beider Oximkombinationen (HI-6 mit Trimedoxim und HI-6 mit K203) leicht höher ist als bei der alleinigen Therapie mit HI-6. Die effektivere Oximkombination scheint dabei HI-6 und K203 zu sein (Caisberger et al. 2018). Eine in-vitro-Studie aus dem Jahr 2016 sollte in einem

dynamischen Modell die in-vivo-Bedingungen möglichst realitätsnah abbilden. Die Reaktivierungsleistung der Kombinationstherapie von HI-6 und Obidoxim wurde mit Sarin-, Cyclosarin- und Tabun-vergifteter Acetylcholinesterase gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Anwesenheit des Organophosphats die Reaktivierungsleistung der Oxime wesentlich beeinträchtigt. Die Kombinationstherapie brachte keine wesentlichen Vorteile in Bezug auf die Einzel-Reaktivierungsleistung des jeweils potenteren Oxims. Der wesentliche Vorteil einer Kombinationstherapie wird auch hier in der Vergrößerung des Wirkspektrums gesehen (Worek et al. 2016b).

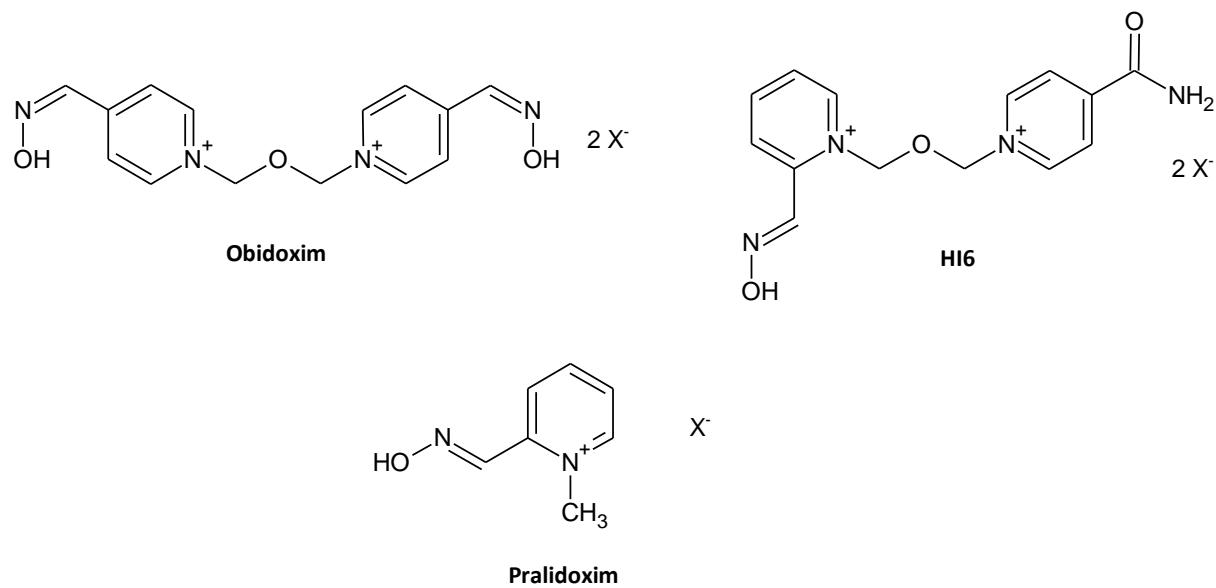


Abb. 8. Strukturformeln von Obidoxim, HI-6 und Pralidoxim

1.9 Eingesetzte Insektizide und deren Struktur

Wichtig für die Auswahl der eingesetzten OP-Insektizide war deren aktuelle Bedeutung für den Einsatz in der Landwirtschaft in Europa. Alle in dieser Studie eingesetzten Organophosphate bzw. deren aktive Metabolite waren – bis auf die Leitsubstanzen Paraoxon-ethyl (PXE) und Paraoxon-methyl (PXM) – in der EU zum Zeitpunkt des Studienbeginns zugelassene Pestizide (siehe EU – Pesticides database der Europäischen Kommission).

Entscheidend für die Toxizität eines Organophosphats bzw. seine Fähigkeit die Acetylcholinesterase im Organismus zu hemmen, ist das Vorliegen einer P=O Bindung. Durch Enzyme der Cytochrom P450 Familie wird eine P=S Bindung in der Leber zu einer P=O Bindung und damit zu seiner aktiven Form verstoffwechselt (Foxenberg et al. 2007). Parathion wird

somit zu Paraoxon, Chlorpyrifos zu Chlorpyrifos-oxon, Dimethoat zu Omethoat und Pirimiphos-methyl zu Pirimiphos-methyl-oxon verstoffwechselt (siehe Abbildung 9).

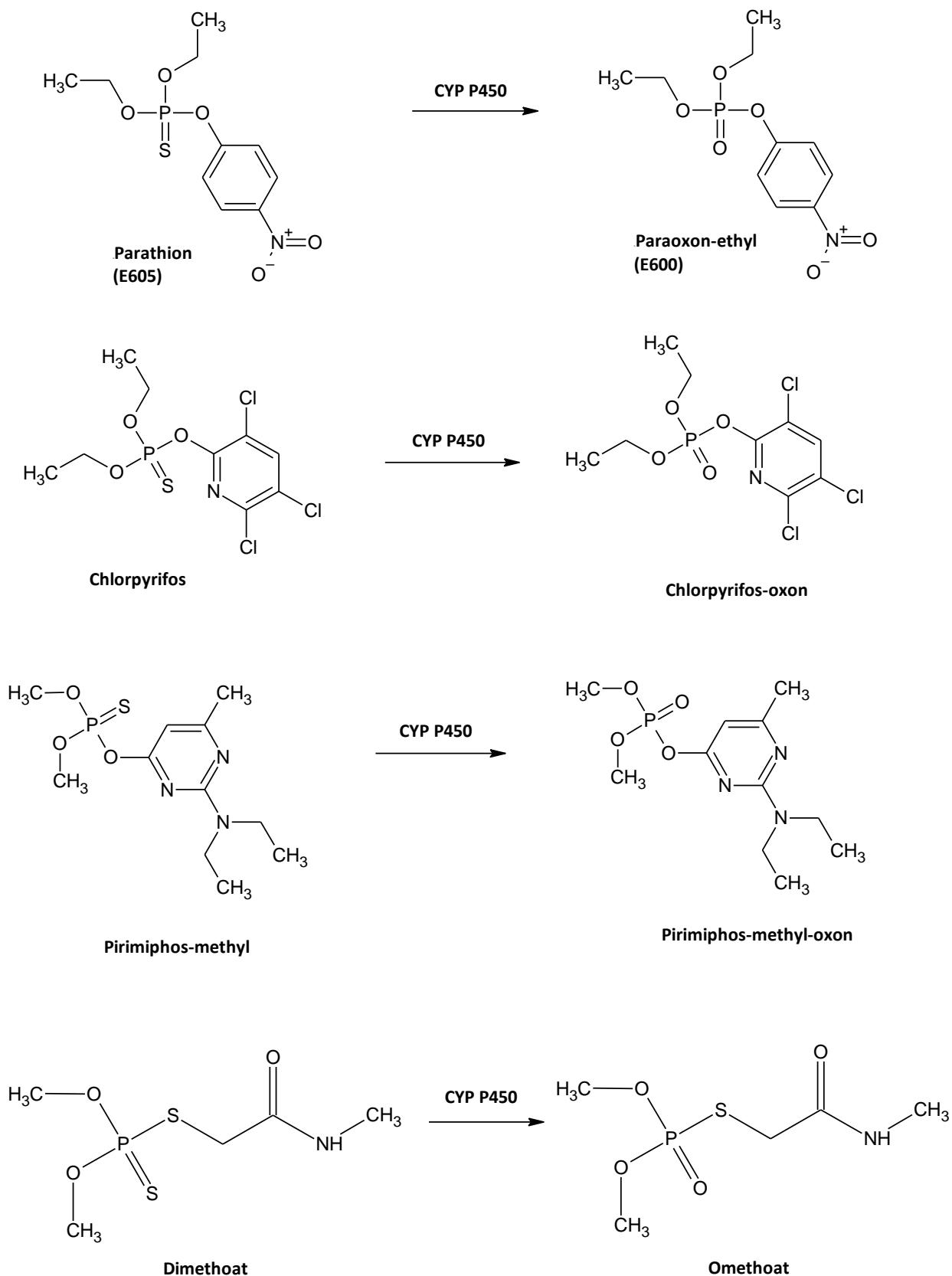


Abb. 9. Beispiele für die Umwandlung von Phosphorthioaten in ihre Oxon-Metaboliten durch Cytochrom P450

Unterschiedliche Abgangsgruppen und Reste (siehe Schraderformel) resultieren in verschiedenen Subklassen von Organophosphaten, zu welchen die Phosphate, Phosphonate, Thiophosphate, Phosphoramidate und Phosphinate zählen (Ballantyne und Marrs 1992). Die Einordnung der verwendeten Substanzen in die jeweilige Subklasse ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

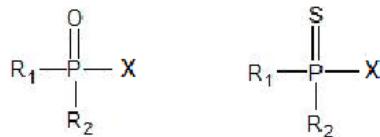
Einteilung der verwendeten Insektizide in Subklassen

Klasse	eingesetzte Substanz
Phosphate	PXE, PXM, CPO, PMO
Phosphorothioate	Omethoat
Phosphorodithioate	Ethoprophos
Phosphoramidate	Fenamiphos

Wie oben beschrieben, wird bei Phosphorylierung des Serinrestes im aktiven Zentrum die Abgangsgruppe (X) abgespalten. Die Stabilität einer phosphorylierten Acetylcholinesterase und damit deren Reaktivierbarkeit ist abhängig von den unterschiedlichen Resten eines jeweiligen Organophosphates. Wie anhand von Tabelle 4 zu erkennen ist, sind PXE und CPO Diethyle, während PXM, Omethoat und PMO zu Dimethylen zählen.

Tabelle 4

Strukturmerkmale eingesetzter Pestizide und deren Einstufung in die WHO-Klassifikation nach Gefahr



Organophosphat	R ₁	R ₂	X	WHO-*
				Klassifikation
Paraoxon-ethyl	OC ₂ H ₅	OC ₂ H ₅	O-4-nitrophenyl	Ia
Paraoxon-	OCH ₃	OCH ₃	O-4-nitrophenyl	Ia
methyl				
Chlorpyrifos-	OC ₂ H ₅	OC ₂ H ₅	O-3,5,6-trichlorpyridin	II
oxon				
Fenamiphos	OC ₂ H ₅	NHCH(CH ₃) ₂	O-3-methyl-4-methylthiophenyl	Ib
Omethoat	OCH ₃	OCH ₃	S-(N-methylcarbamoyl) methylthiophosphat	Ib
Pirimiphos-	OCH ₃	OCH ₃	O-2-Diethylamino-6- methylpyrimidin	II
methyl-oxon				
Ethoprophos	OC ₂ H ₅	SC ₃ H ₇	SC ₃ H ₇	Ia

*bei Nicht-Aufführen auf der Liste der WHO-Klassifikation wurde die Einstufung der Muttersubstanz (Phosphothioat) verwendet.

1.10 Zielsetzung

Vorherige Studien zur Kombinationstherapie von Obidoxim und HI-6 befassten sich vor allem mit der Reaktivierung, der durch Nervenkampfstoffe gehemmten Acetylcholinesterase. Die in-vivo-Studien deuten auf eine positive Auswirkung einer derartigen Kombinationstherapie hin, vor allem durch eine Erweiterung des effektiven Wirkspektrums der jeweiligen Oxime (Worek et al. 2007a). Insbesondere die hohe Anzahl an Vergiftungsfällen mit Organophosphat-Insektiziden im landwirtschaftlichen Bereich in Entwicklungsländern weist daraufhin, wie wichtig es ist, eine derartige Kombinationstherapie nicht nur bei Nervenkampfstoffen, sondern auch an verschiedenen Insektiziden zu erproben.

Ziel dieser Studie ist die Klärung der Fragestellung, ob die Kombinationstherapie aus den Oximen Obidoxim und HI-6 einen positiven oder negativen Effekt bei Verwendung strukturell unterschiedlicher Pestizide hat.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1 Substanzen

2.1.1.1 Allgemein verwendete Substanzen

Obidoxim Dichlorid: MERCK

HI-6 Dichlorid Monohydrat: DR. CLEMENT

Paraoxon-ethyl: DR. EHRENSTORFER

Paraoxon-methyl: DR. EHRENSTORFER

Chlorpyrifos-oxon: DR. EHRENSTORFER

Fenamiphos: DR. EHRENSTORFER

Omethoat: DR. EHRENSTORFER

Pirimiphos-methyl-oxon: DR. EHRENSTORFER

Ethoprophos: DR. EHRENSTORFER

Acetylthiocholin Iodid (**ASCh**): SIGMA

Dithio-bis-nitrobenzoat (**DTNB**): SIGMA

Glutathion: SIGMA

Natronlauge (0,1 M): MERCK

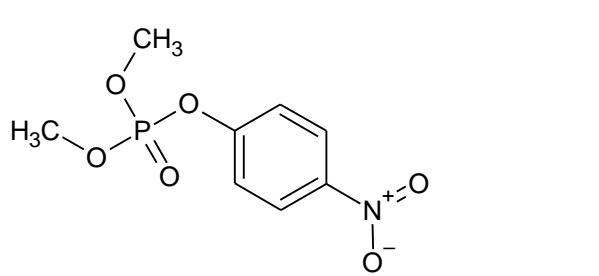
Acetonitril (**ACN**): MERCK

Gelatine (aus Rinderhaut): SIGMA

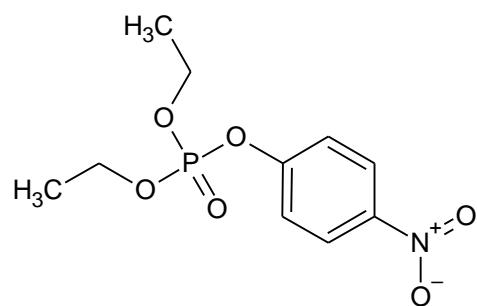
HCl (0,01 M): MERCK

Ingold Standard-Pufferlösungen pH 9,00, pH 7,00 und pH 4,01 (Eichpuffer für pH-Elektroden):

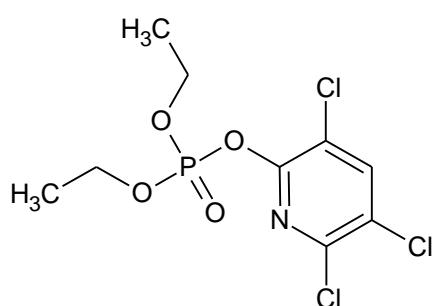
MERCK



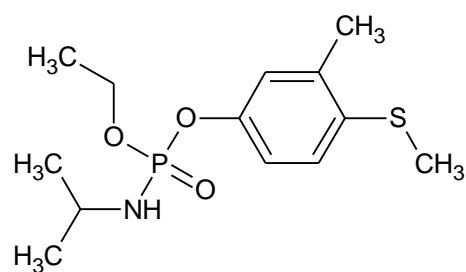
Paraoxon-methyl



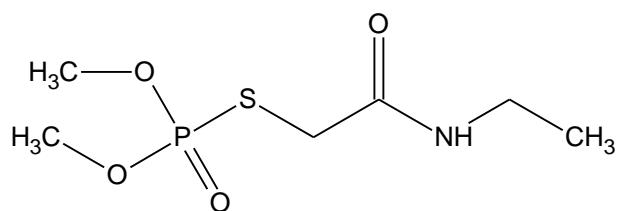
Paraoxon-ethyl



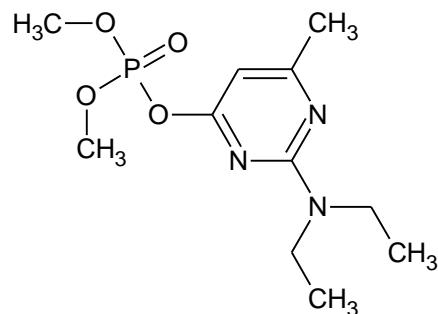
Chlorpyrifos-oxon



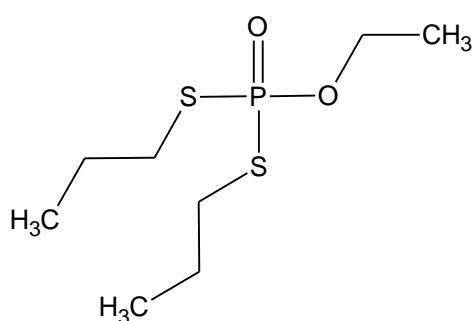
Fenamiphos



Omethoat



Pirimiphos-methyl-oxon



Ethoprophos

Abb. 10. Strukturformeln verwendet Organophosphat-Insektizide

2.1.1.2 Substanzen zur Herstellung der 0,1 M Phosphatpufferlösung (pH 7.4)

Reinstwasser (H_2O): EIGENE HERSTELLUNG

Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4): CARL ROTH

Dinatriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$): CARL ROTH

2.1.1.3 Substanzen zur Herstellung der hypo-osmolaren Phosphatpufferlösung

0,1 M Phosphatpufferlösung (pH 7.4): EIGENE HERSTELLUNG

Reinstwasser (H_2O): EIGENE HERSTELLUNG

Konzentrierte Phosphorsäure (H_3PO_4): MERCK

2.1.2 Geräte und Labormaterialien

2.1.2.1 Allgemeine Geräte und Labormaterialien

Reaktionsgefäß (Eppendorfcups) 0,5 – 2,0 ml: EPPENDORF

Falcon-Röhrchen 15 und 50ml: BECTON DICKINSON LABWARE

Kolbenhubpipetten unterschiedlicher Volumina: EPPENDORF

Direktverdränger-Pipetten unterschiedlicher Volumina: GILSON

pH-Messgerät InoLab Multi 9310 mit pH-Einstabmesskette: WTW

Analysenwaage Cubis MSE 324-S: Sartorius

Flockeisbereiter FRIMONT AF 80 AS 230/50/1 SCOTSMAN

Wasseranlage Mili-Q Reference A+ System MERCK MILIPORE

Zentrifuge Rotina 420R HETTICH

Ultrazentrifuge Optima XPN100 mit Rotoren Typ 19 und Typ 70: BECKMANN-COULTER

Sonoplus HD 2070 Ultraschall-Homogenisator: BANDELIN

Thermomixer C5382: EPPENDORF

Dry Block Heater 1: IKA

Kühlgerät LKUEXV 1610: LIEBHERR

Vortex Genius 3: IKA

Tiefkühlgerät INNOVA 725-G: NEW BRUNSWICK

Polystrol-Einmalküvetten makro 2,5 – 4,0 ml: VWR

Visking Dialyseschlüche 20/32: SERVA

Kälte-Umwälzthermostate F25-MC: JULABO

Optiplex 9010 PC: DELL

Spezialoptik Spektralphotometer UV mc 2: SAFAS

2.1.2.2 Pufferlösungen

Herstellung von 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4

Zur Herstellung der Stammlösung I wurden 71,2 g Dinatriumhydrogenphosphat (Molekulargewicht 177,9 g/mol) abgewogen und zu 4000 ml Reinstwasser gegeben.

Zur Herstellung der Stammlösung II wurden 13,6 g Kaliumhydrogenphosphat (Molekulargewicht 136,1 g/mol) abgewogen und zu 1000 ml Reinstwasser gegeben. Beide Substanzen wurden mit Hilfe eines Magnetrührers im Reinstwasser bei Zimmertemperatur und moderater Röhrgeschwindigkeit gelöst. Daraufhin wurde der pH-Wert von Stammlösung I mit Hilfe der Stammlösung II auf 7,4 eingestellt. Nach Erreichen eines konstanten pH-Wertes wurde die Pufferlösung durch einen Filter der Porengröße 0,45 µm filtriert. Die Abfüllung erfolgte in Braunglasflaschen von 1000 ml Fassungsvermögen. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 2 bis 8 Grad Celsius (Haltbarkeit ca. 2 Monate).

Herstellung von hypo-osmolaren (0,0067 M) Phosphatpuffer pH 7,4

Der hypo-osmolare Puffer wurde aus 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 hergestellt. Durch ein Verdünnungsverhältnis von 1:15 (1 Teil 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 und 14 Teile Reinstwasser) erhielt man den hypo-osmolaren Phosphatpuffer. Der pH-Wert wurde daraufhin, falls notwendig, mit Hilfe von konzentrierter Phosphorsäure auf 7,4 eingestellt. Die Abfüllung erfolgte in Braunglasflaschen von 1000 ml Fassungsvermögen. Gelagert wurde im Kühlschrank bei 2 bis 8 Grad Celsius (Haltbarkeit ca. 1 Monat).

2.1.3 Reagenzien

2.1.3.1 Herstellung von 10 mM 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoësäure (DTNB)-Lösung

3,963 g DTNB (Molekulargewicht: 396,3 g/mol) wurden abgewogen und in 1000 ml Phosphatpuffer (0,1 M/ pH 7,4) gelöst. Nach vollständigem Lösen erfolgte die Qualitätskontrolle mit Hilfe von Glutathion. Aus 9850 ml Phosphatpuffer (0,1 M/ pH 7,4), 50 µl DTNB-Lösung und 100 µl Glutathion-Prüflösung (100 mM) wurde die Messlösung hergestellt. Daraufhin erfolgte die Messung von 3000 µl Messlösung bei 37 Grad Celsius in Polystyrol-Küvette gegen eine Referenzküvette mit 3000 µl Pufferlösung bei 412 nm Absorption. Aus 50 µM DTNB entstehen 100 µM TNB⁻. Die Berechnung erfolgte mit der Formel E=εcd. Der Sollwert der Messlösung für 100 µM TNB⁻ (Extinktionskoeffizient: 13,98 L·mol⁻¹·cm⁻¹) lag bei 1,398 Abs ± 0,07 Abs (5% Abweichung). Lag der Messwert außerhalb dieses Intervalls, wurde die DTNB-Lösung verworfen, ansonsten in schwarzen Poly-Vials zu 10 bis 20 ml aliquotiert, mit gelbem Deckel verschlossen und bei mindestens minus 20 Grad Celsius aufbewahrt (Haltbarkeit: 1 Jahr; bei 4 bis 8 Grad Celsius: 1 Monat).

2.1.3.2 Herstellung von 28,4 mM Acetylthiocholin Iodid (= ASCh)-Lösung

1,643 g ASCh (Molekulargewicht: 289,2 g/mol) wurden in einem Becherglas mit 200 ml Reinstwasser unter geringfügigem Rühren gelöst. Anschließend wurde die ASCh-Lösung einer photometrischen Qualitätskontrolle unterzogen. Dafür wurden zwei Küvetten mit je 3000 µl Phosphatpuffer (0,1 M/pH 7,4) und 100 µl DTNB (10 mM) angesetzt und bei 37 Grad Celsius für 10 Minuten inkubiert. Weiterhin wurde 180 µl Natronlauge (0,1 M) und 20 µl ASCh-Lösung (28,4 mM) in ein Eppendorfcup pipettiert und bei 37 Grad Celsius für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Phosphatpuffer (0,1 M/pH 7,4) dem Substrat/NaOH-Gemisch hinzugefügt und dieses durchmischt. Der einen Küvette wurden 100 µl Phosphatpuffer (0,1 M/pH 7,4) zugegeben (=Referenzküvette). Der anderen Küvette wurden 100 µl der vorinkubierten ASCh-Lösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde geplümpt und die Absorption bei 412 nm gemessen. Die ASCh-Konzentration in der Küvette entsprach 44,375 µM. Die Berechnung erfolgte mit der Formel E=εcd. Ein mM TNB⁻ (ε Extinktionskoeffizient: 13,98 L·mol⁻¹·cm⁻¹; Eyer et al. 2003a) entspricht daher 13,98 Abs. Bei 44,375 µM musste somit ein Zielwert von 620 mAbs ± 31mAbs (5% Abweichung) erreicht werden, andernfalls wurde die

ASCh-Lösung verworfen. Die Proben wurden daraufhin in 2,0 ml Eppendorfcups zu 1,5 ml aliquotiert und bei mindestens minus 20 Grad Celsius tiefgefroren (Haltbarkeit: 1 Jahr).

2.1.3.3 Herstellung der Obidoxim-Stammlösung (200 mM)

143,7 mg Obidoxim-dichlorid (Molekulargewicht: 359,207 g/mol) wurden abgewogen und mit 2,0 ml Reinstwasser gelöst. Daraufhin erfolgte bei der Obidoxim-Lösung eine photometrische Qualitätskontrolle. Die Messung wurde mit einer Referenzküvette in einem Spektrum von 200 bis 400 nm durchgeführt. Für die Messküvette wurde eine Arbeitsverdünnung aus 2,5 µl der Obidoxim-Lösung (200 mM) und 10,0 ml Salzsäure (0,01 N) hergestellt. Dies entspricht einer Konzentration von 50 µM in der Küvette. Für die Referenzküvette wurde Reinstwasser verwendet. Als Pointpeak wurde eine maximale Wellenlänge bei 285nm gesetzt. Der Sollwert der Arbeitslösung betrug 1,73 Abs ± 0,08 Abs (5% Abweichung). Lag der Messwert außerhalb dieses Intervalls, wurde die Obidoxim-Lösung verworfen. Aliquotiert wurden je 0,1 ml der Lösung in beschriftete 2,0 ml große Eppendorfcups. Daraufhin wurden die Lösungen bei minus 80 Grad gelagert (Haltbarkeit: ein halbes Jahr; nach dem Auftauen: 1 Tag). Arbeitsverdünnungen wurden jeden Tag mit destilliertem Wasser hergestellt, auf Eis gelagert und am Ende des Arbeitstages verworfen.

2.1.3.4 Herstellung der HI-6-Stammlösung (200 mM)

150,9 mg mg HI-6 Dichlorid Monohydrat (Molekulargewicht: 377.223 g/mol) wurden abgewogen und mit 2,0 ml Reinstwasser gelöst. Daraufhin erfolgte bei der HI-6-Lösung eine photometrische Qualitätskontrolle. Die Messung wurde mit einer Referenzküvette in einem Spektrum von 200 bis 400 nm durchgeführt. Für die Messküvette wurde eine Arbeitsverdünnung aus 5,0 µl der HI-6-Lösung (200mM) und 10,0 ml Salzsäure (0,01 N) hergestellt. Dies entspricht einer Konzentration von 100 µM in der Küvette. Für die Referenzküvette wurde Reinstwasser verwendet. Als Pointpeak wurde eine maximale Wellenlänge bei 300 nm gesetzt. Der Sollwert der Arbeitslösung betrug 1,21 Abs ± 0,06 Abs (5% Abweichung). Lag der Messwert außerhalb dieses Intervalls, wurde die HI-6-Lösung verworfen. Aliquotiert wurden je 0,1 ml der Lösung in beschriftete 2,0 ml großen Eppendorfcups. Daraufhin wurden die Lösungen bei minus 80 Grad gelagert (Haltbarkeit: ein

halbes Jahr; nach dem Auftauen: 1 Tag). Arbeitsverdünnungen wurden jeden Tag mit destilliertem Wasser hergestellt, auf Eis gelagert und am Ende des Arbeitstages verworfen.

2.1.3.5 Herstellung von Organophosphat-Stammlösungen

Die Stammlösungen (1%) der verschiedenen Organophosphate wurden in Acetonitril vorbereitet und bei Raumtemperatur gelagert. Kurz vor den Versuchen wurden sie mit destilliertem Wasser angemessen verdünnt.

2.1.4 Enzympräparate

Acetylcholinesterase aus Hämoglobin-freien Erythrozyten-Membranen (= Ghosts)

Die Gewinnung der Acetylcholinesterase aus Hämoglobin-freien Erythrozyten-Membranen (= Ghosts) erfolgte dem Prinzip nach der Arbeit von Worek und al. 2004. Heparin-Vollblut wurde einem männlichen Spender entnommen und für 10 Minuten bei 2.800 x g und 4 Grad Celsius zentrifugiert. Daraufhin wurde das abgetrennte Plasma abpipettiert, in Poly Vials abgefüllt und bei minus 80 Grad tiefgefroren. Die übergebliebenen Erythrozyten wurden im Verhältnis 1:2 mit Phosphatpuffer (0,1 M/pH 7,4) gemischt. Anschließend wurde erneut wie oben zentrifugiert und der entstandene Überstand inklusive des „Buffycoats“ (= nach Sedimentation entstandene Leukozytenschicht zwischen Erythrozyten und Plasma) isoliert und verworfen (= 1. Waschvorgang). Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis der Überstand klar war, mindestens waren jedoch zwei Waschvorgänge nötig. Daraufhin wurden alle gewaschenen Erythrozyten zusammengeführt und mit hypo-osmolarem (0,0067 M/pH 7,4/ 4 Grad Celsius) Phosphatpuffer im Becherglas hämolysiert. Die Ultrazentrifugenröhren wurden gleich voll mit Hämolysat befüllt und in den vorgekühlten Rotor der Zentrifuge gestellt. Dann wurde mit der Ultrazentrifugation bei 50.000 x g, 4 Grad Celsius für 30 Minuten begonnen. Im Anschluss daran wurde der Überstand abgegossen (= dekantiert), ohne jedoch die milchig-trübe Flüssigkeit (=Ghost) zu verwerfen und mit hypo-osmolaren Phosphatpuffer aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis der Überstand klar und der Bodensatz milchig-weiß war, in der Regel zwei Mal. War der letzte Überstand klar, so wurde mit Phosphatpuffer (0,1 M/pH 7,4) aufgefüllt und ein letztes Mal bei 100.000 x g, 4 Grad

Celsius für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wie oben dekantiert und die Ghosts zusammengeführt. Daraufhin wurden die Ghosts mit Phosphatpuffer (0,1 M/pH 7,4) verdünnt, bis sich bei der photometrischen Aktivitätsbestimmung ein Wert von $170 \pm 8,5$ mE/min (Abweichung von 5%) einstellte. Das Ghost-Puffer-Gemisch wurde unter ständigem Rühren in Eppendorfcups oder Poly Vials aliquotiert und bei minus 80 Grad Celsius eingefroren. Aufgetaute und bereits verwendete Proben konnten bei akzeptabler Ghost-Aktivität mehrfach eingefroren, aufgetaut und benutzt werden. Vor den Experimenten wurden die Proben drei Mal für je 5 Sekunden mit dazwischenliegenden 30 Sekunden Zeitabständen durch einen Sonoplus HD 2070 Ultraschall-Homogenisator der Firma Bandelin homogenisiert, um eine homogene Probenmatrix für kinetische Untersuchungen zu erreichen.

2.1.5 Firmenregister

Bandelin, Berlin, Deutschland

Beckmann-Coulter, Brea, USA

Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Dell, Round Rock, USA

Dr. Clement, Defence Research Establishment Suffield, Kanada

Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich

Hettich, Tuttlingen, Deutschland

IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland

Julabo, Seelbach, Deutschland

Liebherr, Bulle FR, Schweiz

Merck, Darmstadt, Deutschland

Merck Milipore, Burlington, USA

New Brunswick, Edison, USA

Safas, Monaco, Monaco

Sartorius, Göttingen, Deutschland

Serva, Heidelberg, Deutschland

Scotsman, Vernon Hills, USA

Sigma, Deisenhofen, Deutschland

VWR International, Radnor, USA

WTW, Weilheim, Deutschland

2.2 METHODEN

2.2.1 Grundlagen der Photometrie

Als Photometrie bezeichnet man eine Analysemethode im Wellenlängenbereich des sichtbaren (380 bis 780 nm) und des ultravioletten Lichtes (10 bis 380 nm). Absorption von Licht wird durch die Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit der Elektronenhülle gelöster Moleküle hervorgerufen. Lichtenergie wird dabei meist in Wärmenergie umgewandelt. Die Intensität des Lichtes, welches auf eine Probe fällt, wird durch Absorption abgeschwächt. Die Durchlässigkeit (= Transmission) einer Substanz für Licht einer bestimmten Wellenlänge (= monochromatisches Licht) ist definiert als Quotient aus der Intensität eingestrahlten und ausgestrahlten Lichtes (siehe Formel 1).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

T = Transmission

I_0 = Intensität eingestrahlten Lichtes

I = Intensität ausgestrahlten Lichtes

Das Lambert-Beer-Gesetz beschreibt den Zusammenhang zwischen Absorption von monochromatischem Licht (= Extinktion) und der Konzentration eines absorbierenden Stoffes. Die Extinktion lässt sich mathematisch als negativer dekadischer Logarithmus der Transmission beschreiben.

$$E = -\log T = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (2)$$

E = Extinktion

T = Transmission

ε = molarer Extinktionskoeffizient ($\text{l/mol} \cdot \text{cm}$)

c = Konzentration der absorbierenden Substanz (mol/l)

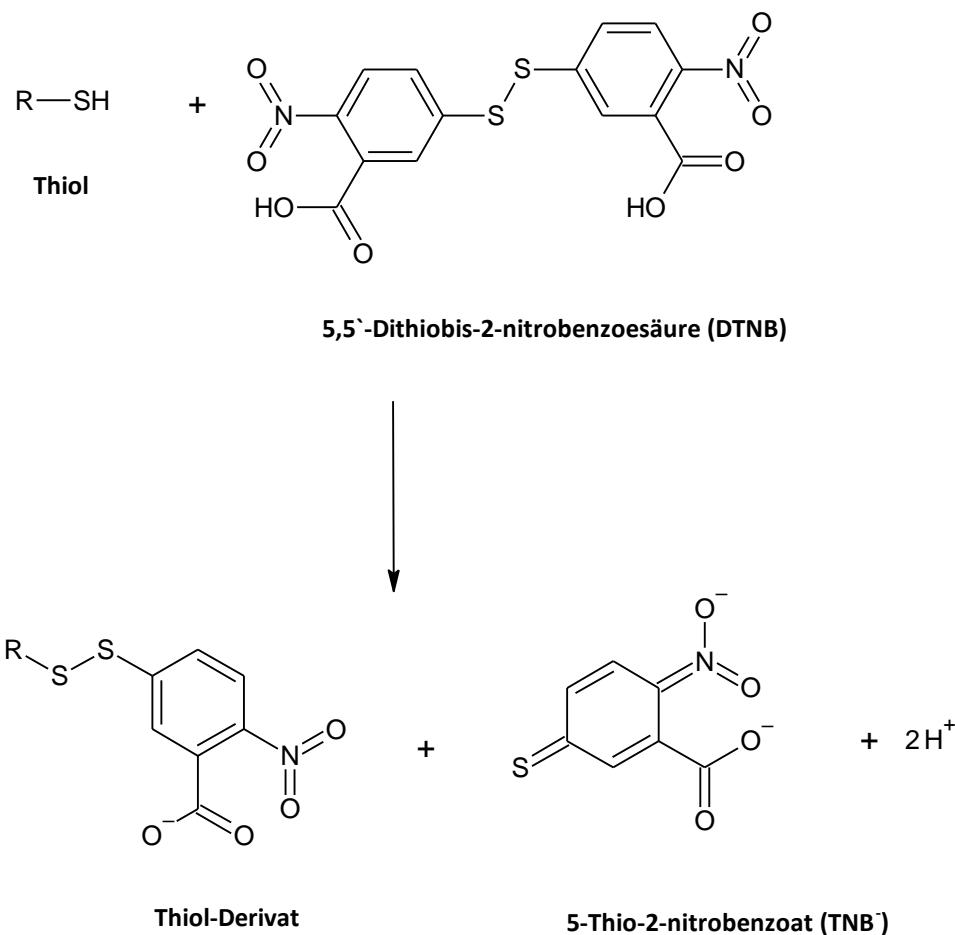
d = Schichtdicke (cm)

Der molare Extinktionskoeffizient beschreibt die Extinktion einer 1-molaren-Lösung bei einer bestimmten Wellenlänge für eine Schichtdicke von 1 cm und ist substanzspezifisch. Damit das Lambert-Beer-Gesetz zutrifft, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. Zunächst muss eine ausreichende Verdünnung vorliegen, da bei höheren Stoffkonzentrationen aufgrund gegenseitiger Beeinflussung durch chromophore Gruppen kein linearer Zusammenhang mehr zwischen Extinktion und Konzentration besteht. Ferner sollte das Lösungsmittel das Licht der verwendeten Wellenlänge möglichst wenig absorbieren (Perkampus 1986; Kunze und Schwedt 2009; Otto 2012).

2.2.2 Ellmann Essay

2.2.2.1 Grundlagen

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoësäure (DTNB) wurde das erste Mal durch George Ellmann zur Bestimmung von Thiol-Verbindungen verwendet (Ellman 1958). Thiole spielen eine wichtige Rolle bei Proteinen, welche die Aminosäure Cystein enthalten. In der Grundreaktion reagiert eine Thiol-Verbindung mit DTNB. Es wird TNB freigesetzt, welches spontan zu TNB^- hydrolysiert. Bei TNB^- handelt es sich um einen gelben Farbstoff, welcher photometrisch bei 412 nm messbar ist (Riddles et al. 1983; siehe Abbildung 11).

**Abb. 11.** Ellmann-Reaktion

2.2.2.2 Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität

Die ursprüngliche Ellman-Reaktion macht man sich auch bei der kolorimetrischen Bestimmung der Acetylcholinesterase zu Nutze (Ellman et al. 1961). Im Organismus hydrolysiert die Acetylcholinesterase Acetylcholin zu Cholin und Acetat. Acetat wird daraufhin zügig deprotoniert (Dvir et al. 2010; siehe Abbildung 3). Durch Austausch eines Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom erhält man Acetylthiocholin. Die Acetylcholinesterase hydrolysiert dieses zu Thiocholin und Acetat. DTNB reagiert zusammen mit Thiocholin. Es entsteht der gelbe Farbstoff TNB⁻ (siehe Abbildung 12). Die Zunahme der gelblichen Farbe über die Zeit ist somit ein direktes Maß für die Aktivität der Acetylcholinesterase und kann durch Extinktionsmessungen bestimmt werden (Worek et al. 1999b).

Die Acetylcholinesteraseaktivität wurde photometrisch bei 412 nm mit dem Spezialoptik Spektralphotometer UV mc 2 der Firma Safas bestimmt. Alle Untersuchungen wurden bei 37 Grad und einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Für die Messansätze wurden

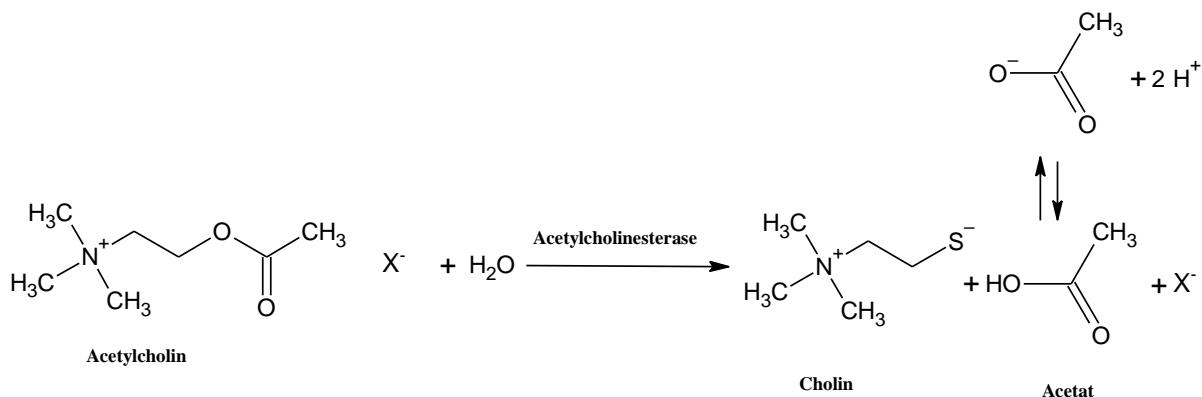
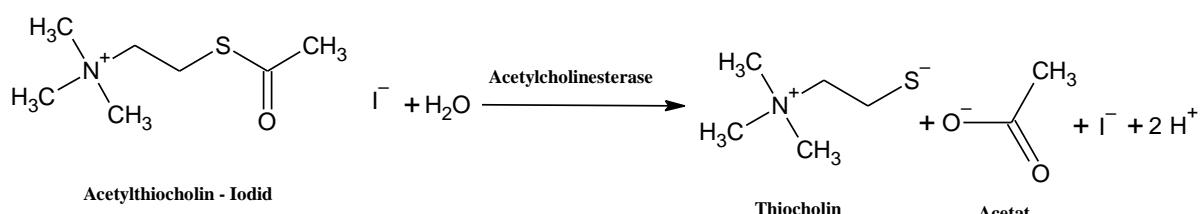
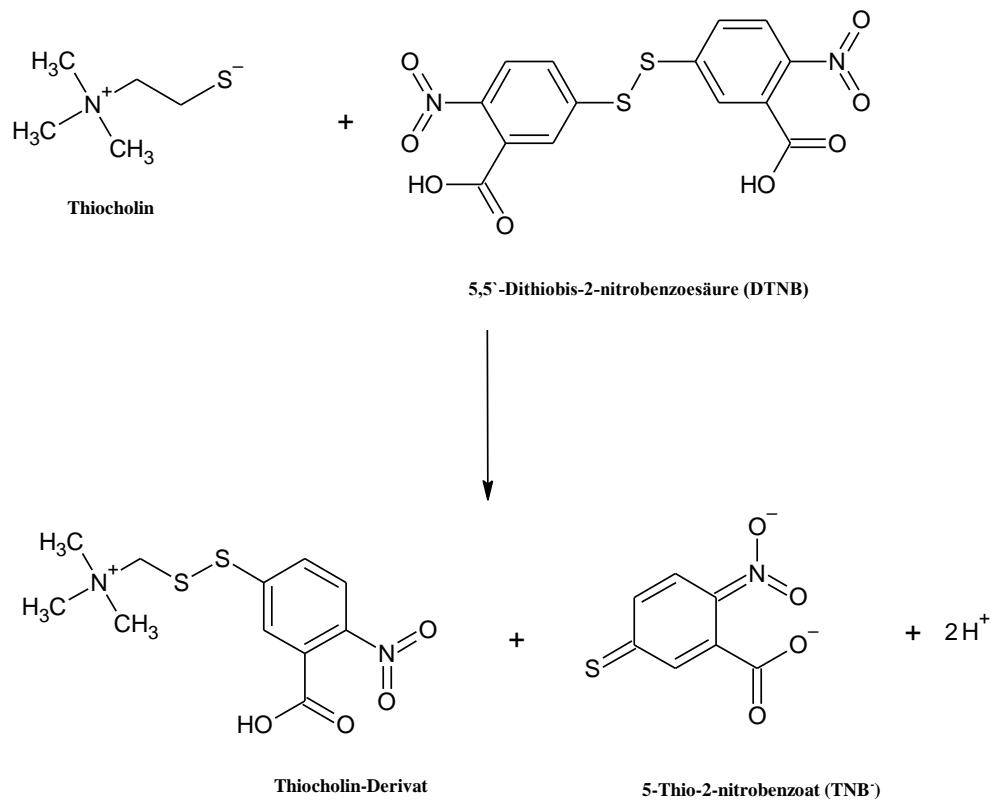
Polystyrol-Einmalküvetten verwendet. Den Messansatz für die Bestimmung unverdünnter Acetylcholinesterase-Aktivität zeigt Tabelle 5. Um den Hemmeffekt phosphorylierten Oxims zu reduzieren, wurden zusätzlich Messungen mit verdünnter Acetylcholinesterase durchgeführt. Den Messansatz für die Bestimmung 100-fach verdünnter Acetylcholinesterase-Aktivität stellt Tabelle 6 dar.

Tabelle 5

Messansatz für die Bestimmung unverdünnter Acetylcholinesteraseaktivität			
Substanz	µl in Küvette	Konzentration in mM	Endkonzentration (Küvette) in mM
Phosphatpuffer (pH 7,4)	3000	100	95,2
DTNB	100	10	0,3
Probe	20		
Acetylthiocholin	50	28,4	0,45

Tabelle 6

Messansatz für die Bestimmung verdünnter Acetylcholinesteraseaktivität			
Substanz	µl in Küvette	Konzentration im Ansatz in mM	Endkonzentration (Küvette) in mM
Phosphatpuffer (pH 7,4)	2000	100	~ 95,2
DTNB	100	10	0,3
Probe	1000		
Acetylthiocholin	50	28,4	0,45

Hydrolyse von Acetylcholin durch Acetylcholinesterase im Organismus**1.Schritt: Hydrolyse von Acetylthiocholin durch Acetylcholinesterase****2.Schritt: Ellman-Reaktion****Abb. 12.** Prinzip der Bestimmung der Cholinesteraseaktivität

2.2.3 Vorbereitung inhibierter Acetylcholinesterase

Acetylcholinesterase aus Hämoglobin-freien Erythrozyten-Membranen (= Ghosts) wurden jeweils mit Paraoxon-ethyl, Paraoxon-methyl, Chlorpyrifos-oxon, Pirimiphos-methyl-oxon, Omethoat, Ethopropofos und Fenamiphos in unterschiedlichen Konzentrationen für 15 Minuten bei 37 Grad Celsius inkubiert, um möglichst eine Hemmung von 95% der ursprünglichen Cholinesteraseaktivität vor Dialyse zu erreichen. Die verwendeten Konzentrationen der unterschiedlichen Organophosphat-Verbindungen lassen sich anhand von Tabelle 3 ablesen. Um die Organophosphate zu entfernen, wurden die behandelten Ghosts gegenüber Phosphatpuffer (0,1 M/ pH 7,4) über Nacht bei 4 Grad Celsius mit Hilfe eines Visking Dialyseschlauches der Firma Serva dialysiert. Um die Abwesenheit des Inhibitors nachzuweisen, wurden daraufhin – nach vorheriger Inkubation bei 37 Grad – die Aktivität der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe gemessen. Durch Spontanreaktivierung reduzierte sich dabei die Hemmung teilweise deutlich (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7

Hemmung der Acetylcholinesterase durch verschiedene Pestizide vor und nach Dialyse

Substanz	Konzentration in µM	Hemmung	
		vor Dialyse in %	nach Dialyse in %
Paraoxon-ethyl	0,4	99.2	98.0
Paraoxon-methyl	1	96.4	87.3
Chlorpyrifos-oxon	1	99.2	97.6
Pirimiphos-methyl- oxon	10	94.2	50.0
Omethoat	235	95.0	53.8
Ethopropofos	300	94.2	77.9
Fenamiphos	429	97.1	98.2

2.2.4 Reaktivierung Organophosphat-gehemmter Acetylcholinesterase

Die Oxim-induzierte Reaktivierung von Organophosphat gehemmter Acetylcholinesterase kann in zwei Schritte eingeteilt werden (Aldridge und Reiner 1972). In einem ersten Schritt reagiert das Organophosphat-gehemmte Enzym [EP] zusammen mit dem Oxim [OX] zu einem Komplex aus gehemmtem Enzym und Oxim [EPOX]. Im zweiten Schritt reagiert dieser Komplex weiter zum enthemmten Enzym [E] und einem phosphorylierten Oxim [POX] (siehe Abbildung 13). K_D beschreibt die Dissoziationskonstante und ist umgekehrt proportional zur Affinität des Oxims gegenüber dem gehemmten Enzym. k_r stellt die Reaktivitätskonstante der Oxim-indizierten Reaktivierung dar.



Abb. 13. Reaktivierung Organophosphat-gehemmter Acetylcholinesterase nach Aldridge und Reiner

2.2.5 Bestimmung der Reaktivierungskonstanten

Um das Reaktivierungspotential eines Oxims quantifizieren zu können, ist es wichtig, Reaktivierungskonstanten aufzustellen. Die Bestimmung der Reaktivierungskonstanten erfolgte nach dem Prinzip der Arbeit von Worek und al. 2010. Zur Bestimmung der Reaktivierungskonstanten wurde die diskontinuierliche Methode verwendet, d. h. gehemmten Ghosts wurde einmalig ein geringes Volumen definierter Oxim-Konzentration hinzugefügt ($t = 0$ min), während dieser Ansatz über den gesamten Zeitraum inkubiert und mehrmals eine Überführung kleinerer Aliquote in die Kuvette stattfand, um die Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten (hier: 2, 7, 12, 20, 30, 45, 60 min) mittels Ellman-Assay zu bestimmen (Wang und Braid 1967). Die Regressionsanalysen wurden mit Hilfe des Kurvenanpassungsprogramms Prism in der Version 8.0.1. durchgeführt (GraphPad Software, San Diego, CA).

2.2.5.1 Bestimmung von k_{obs}

k_{obs} stellt die scheinbare Reaktivierungskonstante pseudo-1. Ordnung dar.

Lineare Regressionsanalyse:

Die Konstante k_{obs} wurde aus folgender Gleichung ermittelt:

$$\ln\left(\frac{v_0-v_t}{v_0-v_i}\right) = -k_{obs} \times t \quad (3)$$

v_0 = Aktivität der nativen Kontrolle

v_t = Aktivität Reaktivierungsansatz zum Zeitpunkt t

v_i = Restaktivität im Hemmansatz

Trägt man den Terminus $\ln\left(\frac{v_0-v_t}{v_0-v_i}\right)$ gegenüber der Zeit t in einem Diagramm auf den X und Y-Achsen auf, so ergibt die Steigung der Geraden k_{obs} .

Nicht-lineare Regressionsanalyse

Bei der nicht-linearen Regressionsanalyse wurde die Konstante k_{obs} aus folgender Gleichung ermittelt:

$$vt = v_0 \times (1 - e^{-k_{obs} \times t}) \quad (4)$$

2.2.5.2 Bestimmung von K_D und k_r

Um die Dissoziationskonstante K_D sowie die Reaktivierungskonstante k_r zu erhalten, wurde k_{obs} für verschiedene Oxim-Konzentrationen (hier: 30, 50, 100, 300, 500, 700, und 1000 μM) bestimmt. Es gilt folgender Zusammenhang:

$$k_{obs} = \frac{k_r \times [OX]}{K_D + [OX]} \quad (5)$$

Die Auftragung von k_{obs} gegenüber der Oximkonzentration und die anschließende nicht-lineare Regressionsanalyse lieferten die Konstanten K_D und k_r .

2.2.5.3 Bestimmung von k_{r2}

Die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante der 2. Ordnung ergibt sich aus dem Verhältnis von k_r zu K_D :

$$k_{r2} = \frac{k_r}{K_D} \quad (6)$$

2.2.6 Reaktivierung von Organophosphat-gehemmten Proben mit Obidoxim, HI-6 und deren Kombination

Die Acetylcholinesterase wurde mit 0,2%-iger Gelatine gemischt, um die Enzymaktivität über einen längeren Zeitraum bei 37 Grad Celsius stabil halten zu können. Der Zeitpunkt der Zugabe des Oxims stellte den Startzeitpunkt ($t = 0 \text{ min}$) der Untersuchung dar. Als Oximkonzentrationen im Ansatz wurden je 30 μM Obidoxim, HI-6 und deren Kombination bzw. 10 μM Obidoxim, 40 μM HI-6 und Obidoxim + HI-6 (10 + 40 μM) gewählt. In bestimmten Zeitabständen ($t = 2, 7, 12, 20, 30, 45, 60 \text{ min}$) wurde vom Reaktivierungsansatz 20 bzw. 1000 μl Aliquot entnommen, um die Aktivität der Acetylcholinesterase mittels Ellman-Assay (siehe Tabelle 5) zu messen. Die Messungen wurden bei 37 Grad Celsius und pH von 7,4 durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Ansätze in Doppelbestimmung ($n = 2$) vorbereitet (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8

Ansätze für die Reaktivierung gehemmter, unverdünnter Acetylcholinesterase

Substanz	Kontrolle	Hemmansatz	Reaktivierung
Native Acetylcholinesterase	50 μl	-	-
Gehemmte Acetylcholinesterase	-	50 μl	200 μl
Phosphatpuffer Gelatine (0.2%)	50 μl	50 μl	200 μl
Oxim	-	-	4 μl

Um den hemmenden Effekt von gebildeten phosphoryliertem-Oxim zu reduzieren, wurden zudem Messungen mit 100-fach verdünnter Acetylcholinesterase durchgeführt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9

Ansätze für die Reaktivierung gehemmter, verdünnter Acetylcholinesterase

Substanz	Kontrolle	Hemmansatz	Reaktivierung
Native Acetylcholinesterase	50 µl	-	
Gehemmte Acetylcholinesterase	-	50 µl	150 µl
Phosphatpuffer- Gelatine (0.2%)	2475 µl	2475 µl	7425 µl
Phosphatpuffer (0.1M/pH 7.4)	2475 µl	2475 µl	7425 µl
Oxim	-	-	3 µl

Die Reaktivierung in % zum Zeitpunkt t wurde nach folgender Formel bestimmt (de Jong und Wolring 1978):

$$\%reactivation_t = \left(\frac{(AIR_t - AR) - AI}{A - AI} \right) \times 100 \quad (7)$$

A= Aktivität der nativen Kontrolle

AR= Aktivität in Anwesenheit von Oxim

AI= Aktivität des Hemmansatzes

AIR_t= Aktivität des Hemmansatzes nach Behandlung mit Oxim (= Reaktivierungsansatz)

Die Messung der Kontrolle und des Hemmansatzes wurden in der Regel vor Startpunkt des Versuches (t= 0 min) durchgeführt. Ausnahmen waren die Dimethyl-Organophosphate (PXM, PMO, Omethoat), welche hohe Spontanreaktivierungen zeigten, weshalb der Hemmansatz (hier: Hemmansatz wie Reaktivierungsansatz ohne Oximzugabe) über die Zeit (t= 2, 7, 12, 20, 30, 45, 60 min) gemessen wurde, um die effektive Reaktivierungsleistung des jeweiligen Oxims zu erhalten.

2.2.7 Hemmung der Acetylcholinesterase durch verwendete Oxime

Als Oximkonzentrationen in der Küvette wurden je 30 µM Obidoxim, HI-6 und deren Kombination bzw. 10 µM Obidoxim, 40 µM HI-6 und Obidoxim + HI-6 (10 + 40 µM) gewählt. Alle Messungen wurden bei 37 Grad Celsius, pH von 7,4 und in Vierfachbestimmung ($n = 4$) durchgeführt. Die Tabelle 10 zeigt die Zusammensetzungen der Küvetten für die Messung der Kontrolle, des Hemmwertes sowie der Hydrolyse von Acetylthiocholin (= Oximblank) durch das jeweilige Oxim in unterschiedlichen Konzentrationen.

Tabelle 10

Messansätze für die Bestimmung der Oxim-Hemmung

Substanz	µl in Küvette	Kontrolle	Hemmwert	Oximblank
Phosphatpuffer (0.1M/pH 7.4)	3000	X	X	X
DTNB (10mM)	100	X	X	X
Acetylcholinesterase	10	X	X	-
Acetylthiocholin (28.4 mM)	50	X	X	X
Oxim (verschiedene Konzentrationen)	3.2	-	X	X

Die Hemmung ergab sich aus der Formel:

$$100 - \left[\frac{(\text{Hemmwert} - \text{Oximblank})}{\text{Kontrolle}} \right] \times 100 = \% \text{ Hemmung} \quad (8)$$

3. ERGEBNISSE

3.1 Reaktivierung Diethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase

3.1.1 Reaktivierung PXE-gehemmter Acetylcholinesterase

Die Reaktivierung PXE-gehemmter, unverdünnter Acetylcholinesterase durch Obidoxim ($30 \mu\text{M}$) führte zu einem zügigen, biphasischen Anstieg der Enzymaktivität, während mit HI-6 ($30 \mu\text{M}$) ein langsamerer, monophasischer Anstieg beobachtet wurde. Die Kombination von Obidoxim und HI-6 (je $30 \mu\text{M}$) lieferte eine ähnliche Kurve im Vergleich zur alleinigen Obidoximgabe ($30 \mu\text{M}$). Die Reaktivierung bei der Kombination (je $30 \mu\text{M}$) war zu jedem gemessenen Zeitpunkt leicht höher, verglichen mit Obidoxim ($30 \mu\text{M}$) allein (siehe Abbildung 14).

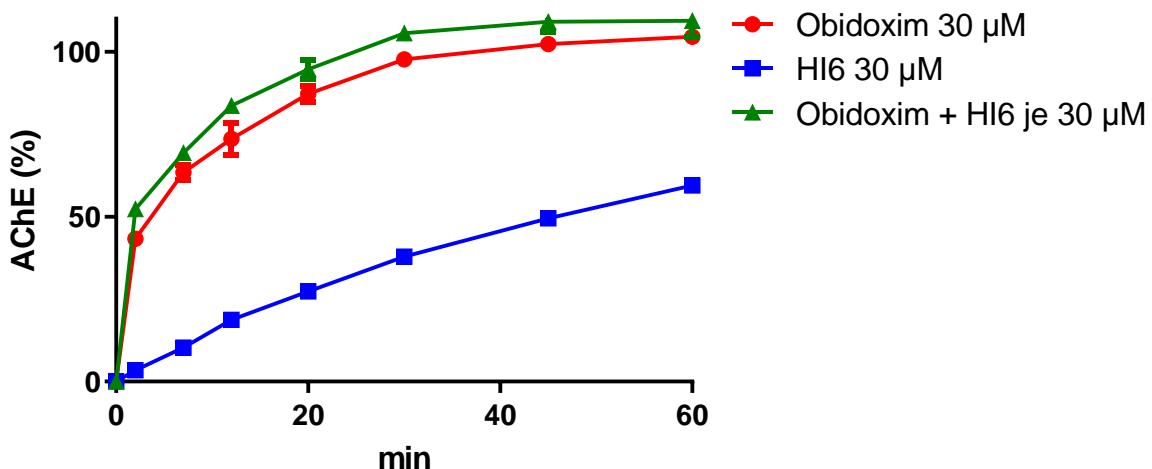


Abb. 14. Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-ethyl gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim ($30 \mu\text{M}$; rot), HI-6 ($30 \mu\text{M}$; blau) oder Obidoxim + HI-6 ($30 \mu\text{M} + 30 \mu\text{M}$; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 2$).

Die 100-fache Verdünnung der Acetylcholinesterase zeigte sowohl für HI-6 (30 µM) als auch für Obidoxim (30 µM) sowie Obidoxim + HI-6 (je 30 µM) einen monophasischen Anstieg. Die Reaktivierung durch Obidoxim (30 µM) bzw. Obidoxim + HI-6 (je 30 µM) verlief im Vergleich zum unverdünnten Versuch schneller. Die Reaktivierung bei der Kombination war zu jedem gemessenen Zeitpunkt leicht geringer, verglichen mit Obidoxim (30 µM) allein (siehe Abbildung 15).

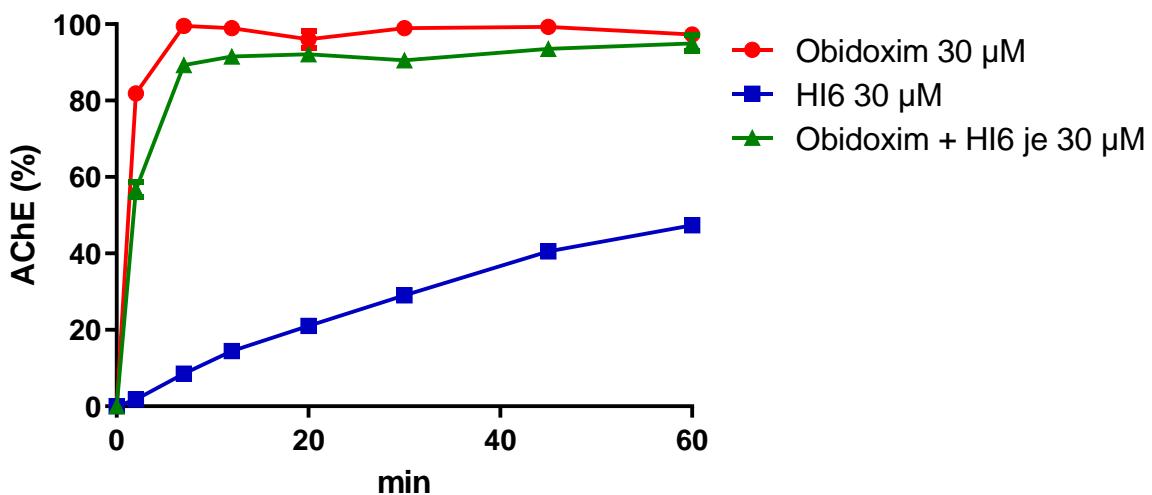


Abb. 15. Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-ethyl gehemmter, 100-fach verdünnter humarer Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Oximblanks wurden von den gemessenen Werten abgezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 2).

Die Reaktivierung PXE gehemmter, unverdünnter Acetylcholinesterase mit unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Abbildung 16) zeigte weiterhin bei der Kombination von Obidoxim + HI-6 (10 μ M + 40 μ M) und Obidoxim (10 μ M) einen biphasischen, bei HI-6 (40 μ M) einen monophasischen Anstieg. Die Reaktivierung mit Obidoxim (10 μ M) verlief schneller und erreichte ein höheres Niveau als mit HI-6 (40 μ M). Eine noch schnellere und höhere Reaktivierung lieferte die Kombinationsgabe von Obidoxim + HI-6 (10 μ M + 40 μ M).

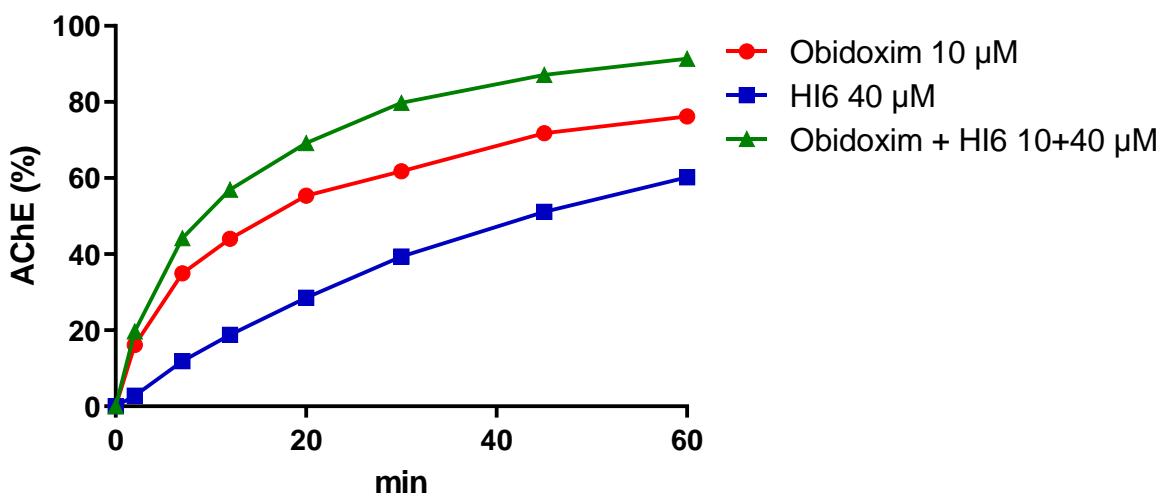


Abb. 16. Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-ethyl gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (10 μ M; rot), HI-6 (40 μ M; blau) oder Obidoxim + HI-6 (10 μ M + 40 μ M; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 2).

3.1.2 Reaktivierung CPO-gehemmter Acetylcholinesterase

Die zeitabhängige Reaktivierung Chlorpyrifos-oxon-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase lieferte vergleichbare Ergebnisse, wie diejenige Paraoxon-ethyl-gehemmter, unverdünnter Acetylcholinesterase. Die Reaktivierungskurven für Obidoxim (30 µM) sowie für Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) verliefen biphasisch, wohingegen sich bei HI-6 (30 µM) ein monophasischer Verlauf darstellte. Die Reaktivierung durch Obidoxim (30 µM) verlief schneller als durch HI-6 (30 µM). Die Zugabe von HI-6 (30 µM) zu Obidoxim (30 µM) führte zu einem geringfügigen Anstieg der Reaktivierungsleistung (siehe Abbildung 17).

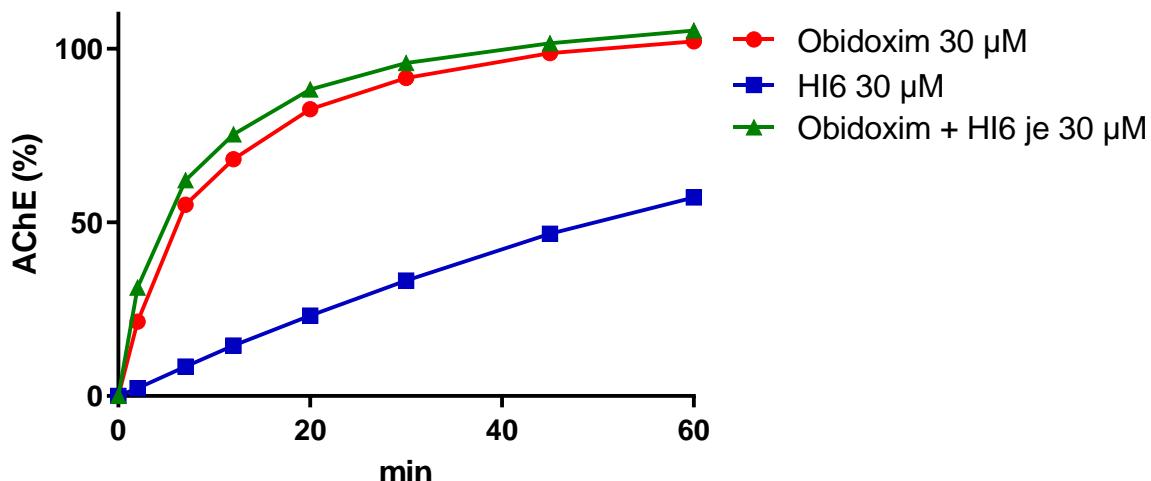


Abb. 17. Zeitabhängige Reaktivierung Chlorpyrifos-oxon-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 2).

Die Reaktivierung Chlorpyrifos-oxon-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase (siehe Abbildung 18) lieferte einen monophasischen Verlauf sowohl für HI-6 (30 µM) als auch für Obidoxim (30 µM) sowie für Obidoxim und HI-6 (je 30 µM). Obidoxim (30 µM) war in der Reaktivierung HI-6 (30 µM) überlegen. Die Reaktivierung durch Obidoxim (30 µM) im Vergleich zu Obidoxim und HI-6 (30 µM) verlief zu jedem Zeitpunkt auf einem geringfügig höheren Reaktivierungsniveau.

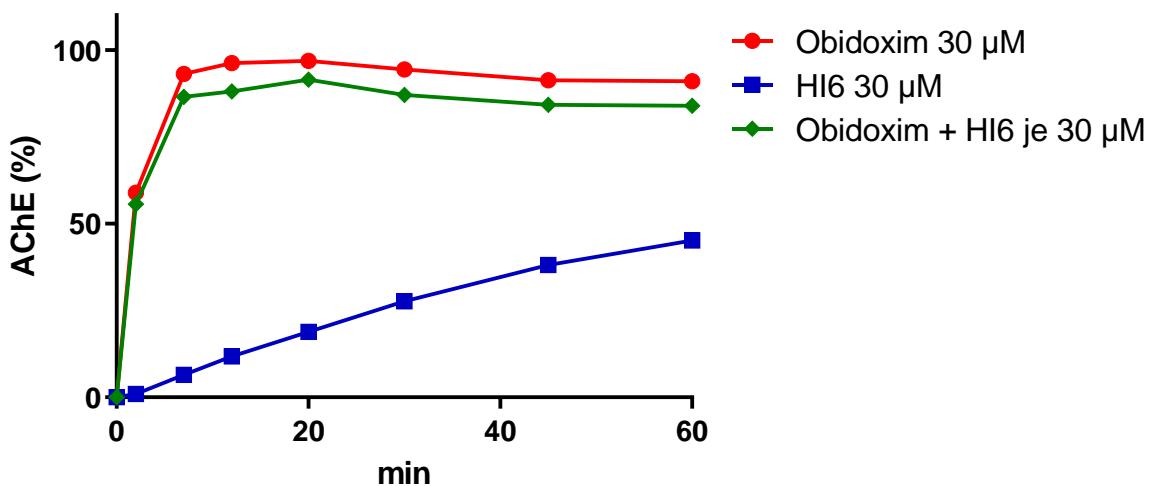


Abb. 18. Zeitabhängige Reaktivierung Chlorpyrifos-oxon-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Oximblanks wurden von den gemessenen Werten abgezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 2).

Die Reaktivierungskurven bei der Reaktivierung Chlorpyrifos-oxon-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase für Obidoxim (10 µM) und Obidoxim und HI-6 (10µM +40 µM) ergaben biphasische, für HI-6 (40 µM) monophasische Anstiege. Die Reaktivierung durch Obidoxim (10µM) war schneller und fiel höher aus als mit HI-6 (40µM). Die Gabe von Obidoxim und HI-6 (10µM +40 µM) steigerte die Reaktivierungsleistung im Vergleich zur Einzelgabe (siehe Abbildung 19).

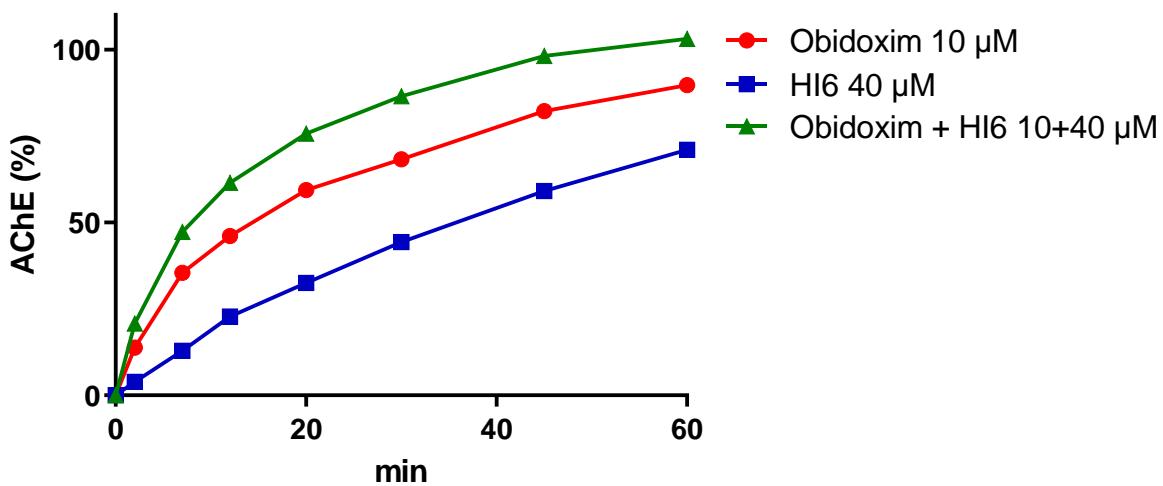


Abb. 19. Zeitabhängige Reaktivierung Chlorpyrifos-oxon-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (10 µM; rot), HI-6 (40 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (10 µM + 40 µM; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 2).

3.2 Reaktivierung Dimethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase

3.2.1 Reaktivierung PXM-gehemmter Acetylcholinesterase

Abbildung 20 zeigt die Reaktivierung PXM-gehemmter Acetylcholinesterase. Die Reaktivierung mit Obidoxim (30 μ M) und Obidoxim + HI-6 (je 30 μ M) zeigte zunächst einen schnellen Anstieg, gefolgt von einem Übergang in eine Plateauphase. Mit HI-6 (30 μ M) war der Anstieg langsamer und deutlich schwächer. Die Kurven der Reaktivierung von Obidoxim (30 μ M) und Obidoxim + HI-6 (je 30 μ M) unterschieden sich nur unwesentlich, waren aber durchgehend auf einem höheren Niveau als bei HI-6 (30 μ M).

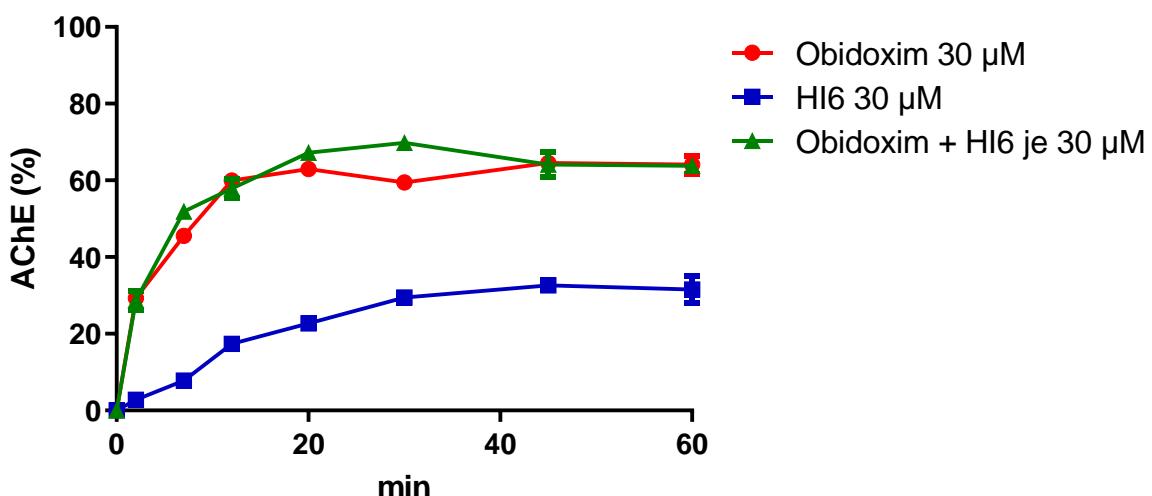


Abb. 20. Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-methyl gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 μ M; rot), HI-6 (30 μ M; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je 30 μ M; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Wegen der hohen Spontanreaktivierung wurde der Hemmwert zu den jeweiligen Messzeitpunkten mitbestimmt und einberechnet. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 2).

Bei der Hemmung der Acetylcholinesterase durch Dimethyl-Organophosphate zeigte sich eine hohe Spontanreaktivierung, welche bei Diethyl-Organophosphaten, Fenamiphos und Ethoprophos vernachlässigbar war. Deshalb musste bei den Dimethyl-OP der Hemmwert über die Zeit mitbestimmt werden und der jeweilige Hemmwert zum Messzeitpunkt in der Formel bei der Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität nach de Jong und Wolring berücksichtigt werden (de Jong und Wolring 1978). Die Spontanreaktivierung Paraoxon-methyl gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase verlief kontinuierlich und erreichte nach einer Stunde nahezu 40% (siehe Abbildung 21).

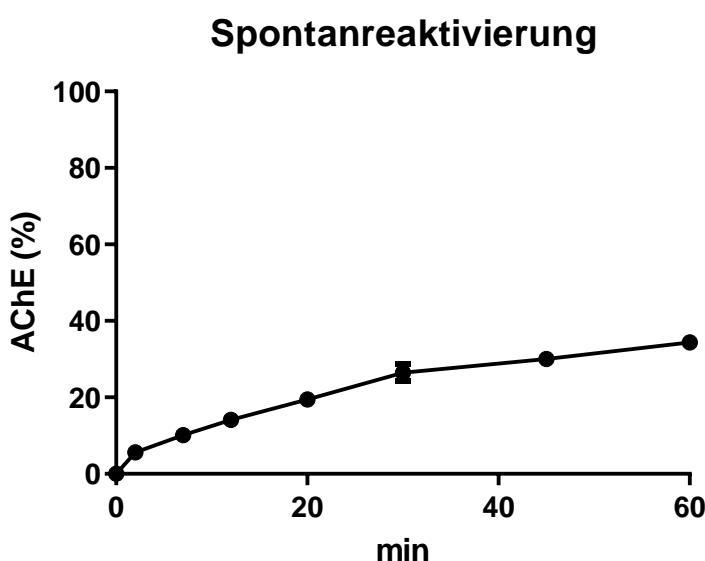


Abb. 21. Zeitabhängige Spontanreaktivierung Paraoxon-methyl gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase. Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 2).

Bei der Reaktivierung Paraoxon-methyl gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase (siehe Abbildung 22) zeigte sich sowohl mit Obidoxim (30 μ M), als auch mit Obidoxim und HI-6 (je 30 μ M) sowie mit HI-6 (30 μ M) ein monophasischer Anstieg. Verglichen mit der unverdünnten Acetylcholinesterase war die Reaktivierung durch Obidoxim (30 μ M) bzw. Obidoxim + HI-6 (je 30 μ M) schneller. Die Reaktivierung durch Obidoxim (30 μ M) im Vergleich zu Obidoxim und HI-6 (30 μ M) verlief zu jedem Zeitpunkt auf einem leicht höheren Reaktivierungsniveau. Ab der 20. bzw. 30 min. war bei allen Reaktivierungskurven ein deutlicher Rückgang in der Reaktivierung zu verzeichnen.

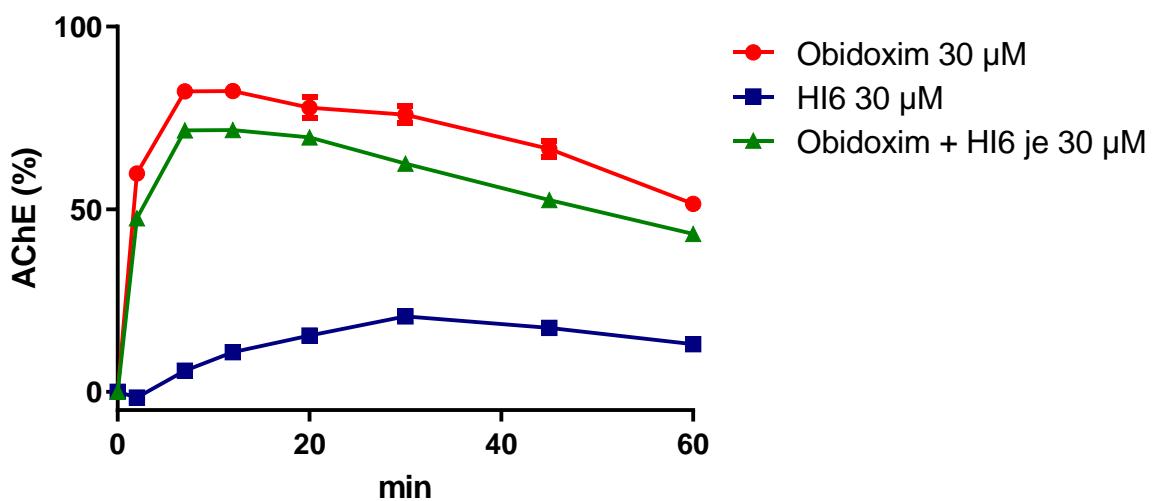


Abb. 22. Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-methyl gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 μ M; rot), HI-6 (30 μ M; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je 30 μ M; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Oximblanks wurden von den gemessenen Werten abgezogen. Wegen der hohen Spontanreaktivierung wurde der Hemmwert zu den jeweiligen Messzeitpunkten mitbestimmt und einberechnet. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 2).

Wie bereits bei unverdünnter Acetylcholinesterase, zeigte sich auch bei Verdünnung (siehe Abbildung 23) eine kontinuierliche Spontanreaktivierung. Diese verlief leicht schneller und erreichte ein insgesamt leicht höheres Reaktivierungsniveau.

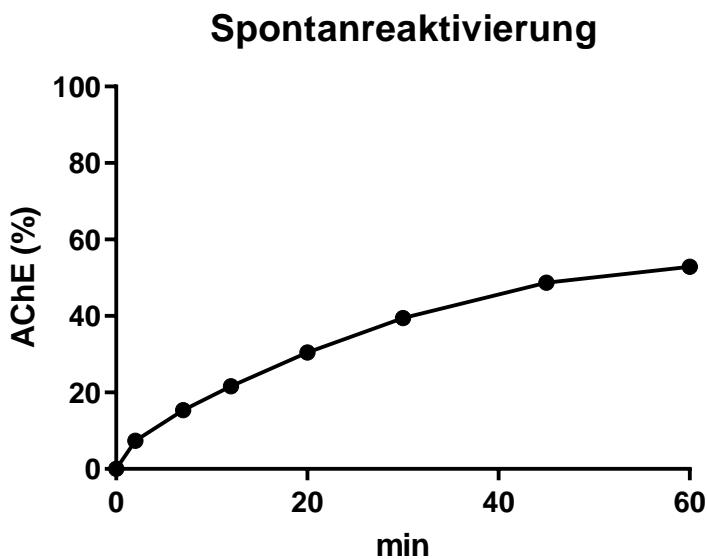


Abb. 23. Zeitabhängige Spontanreaktivierung Paraoxon-methyl gehemmter, verdünnter humaner Acetylcholinesterase. Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 2$).

3.2.2 Reaktivierung Omethoat-gehemmter Acetylcholinesterase

Bei der Reaktivierung Omethoat-gehemmter, unverdünnter Acetylcholinesterase (Abbildung 24) folgte mit Obidoxim (30 µM) sowie mit Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) auf einen steilen Reaktivierungsanstieg ein Übergang in die Plateauphase. Obidoxim (30 µM) und Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) unterschieden sich in ihren Kurvenverläufen nur unwesentlich, waren aber HI-6 (30 µM) deutlich überlegen.

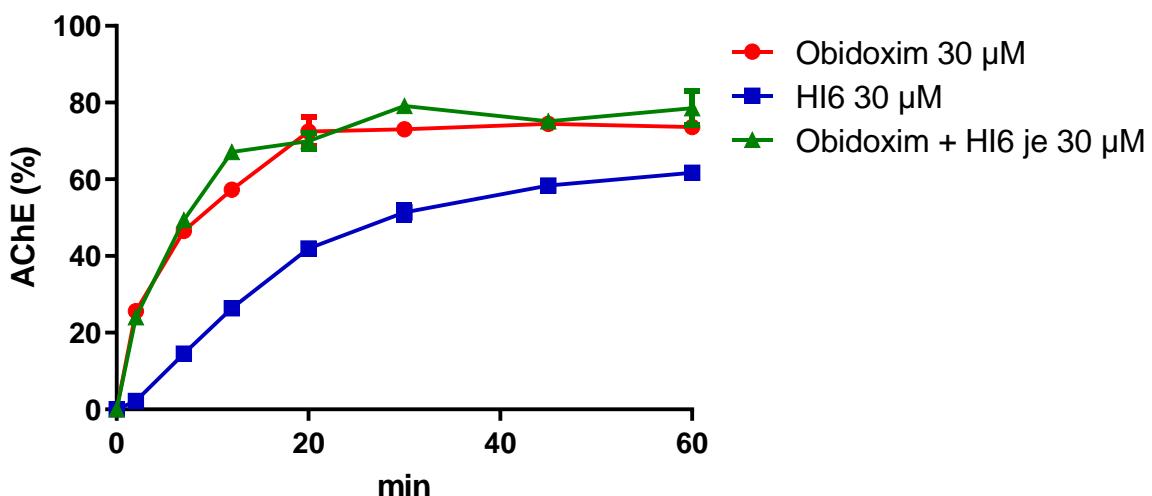


Abb. 24. Zeitabhängige Reaktivierung Omethoat-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je 30 µM; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Wegen der hohen Spontanreaktivierung wurde der Hemmwert zu den jeweiligen Messzeitpunkten mitbestimmt und einberechnet. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 2).

Die zeitabhängige Reaktivierung Omethoat-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase zeigte für Obidoxim (30 µM) sowie für Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) einen schnelleren Anstieg im Vergleich zur unverdünnten Acetylcholinesterase, jedoch nahm die Aktivität der Acetylcholinesterase nach Erreichen eines Maximums kontinuierlich ab. Obidoxim (30 µM) war ein stärkerer Reaktivator als HI-6 (30 µM). Die Reaktivierungswerte der Kombination (je 30 µM) waren mit denen alleiniger Obidoximgabe vergleichbar, jedoch leicht geringer (siehe Abbildung 25).

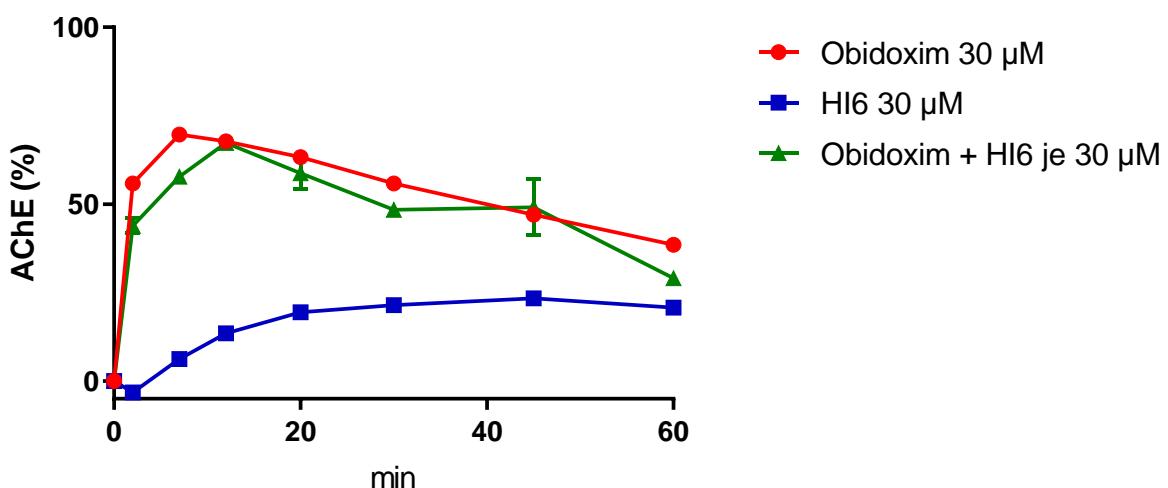


Abb. 25. Zeitabhängige Reaktivierung Omethoat-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je 30 µM; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Oximblanks wurden von den gemessenen Werten abgezogen. Wegen der hohen Spontanreaktivierung wurde der Hemmwert zu den jeweiligen Messzeitpunkten mitbestimmt und einberechnet. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 2).

3.2.3 Reaktivierung Pirimiphos-methyl-oxon-gehemmter Acetylcholinesterase

Die Reaktivierung PMO-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase zeigte für Obidoxim ($30 \mu\text{M}$) eine Überlegenheit gegenüber HI-6 ($30 \mu\text{M}$) auf. Die Kombinationstherapie von Obidoxim und HI-6 (je $30 \mu\text{M}$) erhöhte die Reaktivierung im Vergleich zur alleinigen Obidoximgabe ($30 \mu\text{M}$) geringfügig (siehe Abbildung 26).

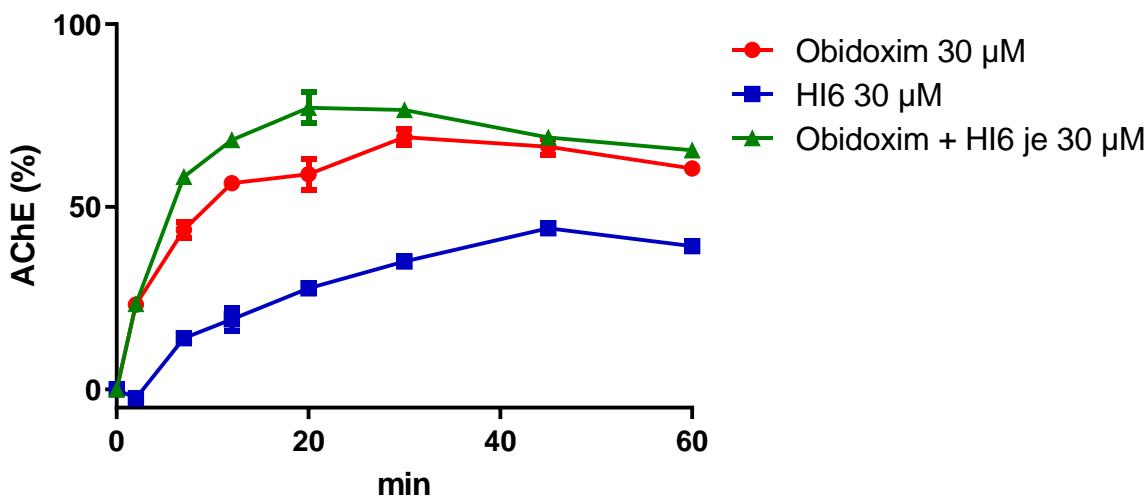


Abb. 26. Zeitabhängige Reaktivierung PMO-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim ($30 \mu\text{M}$; rot), HI-6 ($30 \mu\text{M}$; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je $30 \mu\text{M}$; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Wegen der hohen Spontanreaktivierung wurde der Hemmwert zu den jeweiligen Messzeitpunkten mitbestimmt und einberechnet. Die Daten werden in % der Reaktivierung angegeben (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 2$).

Die Verdünnung und anschließende Reaktivierung PMO-gehemmter humaner Acetylcholinesterase (siehe Abbildung 27) führte sowohl zu einem rascheren Anstieg der Kurven für Obidoxim (30 µM) als auch für Obidoxim und HI-6 (je 30 µM), verglichen mit der Reaktivierung unverdünnter Acetylcholinesterase. Die Reaktivierungswerte der Kombination (30 µM) waren durchgehend geringer als diejenigen alleiniger Obidoximgabe (30 µM). Nach Erreichen eines Maximums sanken die Reaktivierungskurven für Obidoxim (30 µM) sowie für Obidoxim und HI-6 (je 30 µM).

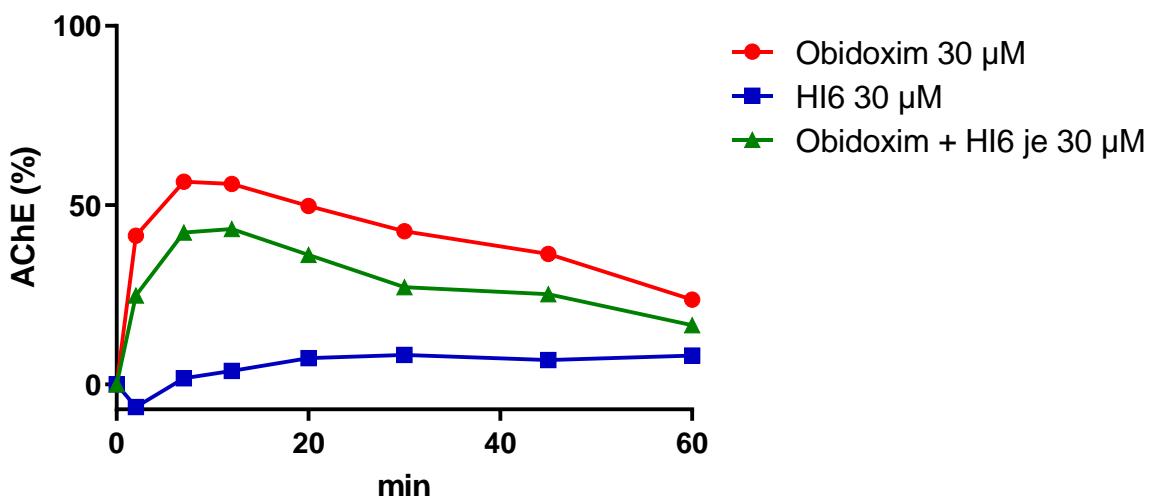


Abb. 27. Zeitabhängige Reaktivierung PMO-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je 30 µM; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Oximblanks wurden von den gemessenen Werten abgezogen. Wegen der hohen Spontanreaktivierung wurde der Hemmwert zu den jeweiligen Messzeitpunkten mitbestimmt und einberechnet. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 2).

3.3 Reaktivierung weiterer OP-gehemmter Acetylcholinesterase

3.3.1 Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase

Bei der Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase zeigten sich sowohl für HI-6 (30 µM), Obidoxim (30 µM), als auch für Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) monophasische Verläufe. Die Reaktivierung durch Obidoxim (30 µM) war der Reaktivierung durch HI-6 (30 µM) überlegen, beide reaktivierten die Acetylcholinesterase jedoch nur unzureichend. Die Kombination aus Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) brachte keine nennenswerten Vorteile (siehe Abbildung 28).

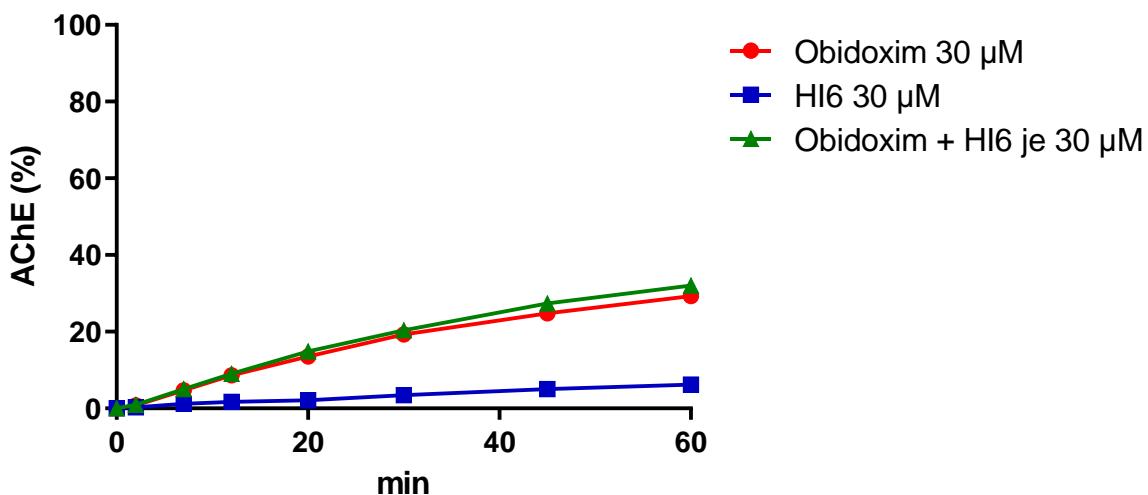


Abb. 28. Zeitabhängige Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 2).

Auch die Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase (siehe Abbildung 29) lieferte für Obidoxim (30 µM), HI-6 (30 µM) und deren Kombination (30 µM) monophasische Reaktivierungsanstiege. Die Reaktivierung durch Obidoxim (30 µM) verlief effektiver als durch HI-6 (30 µM). Insgesamt waren beide Oxime lediglich schwache Reaktivatoren. Die Kombination aus Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) zeigte einen fast identischen Kurvenverlauf wie die alleinige Obidoximgabe (30 µM).

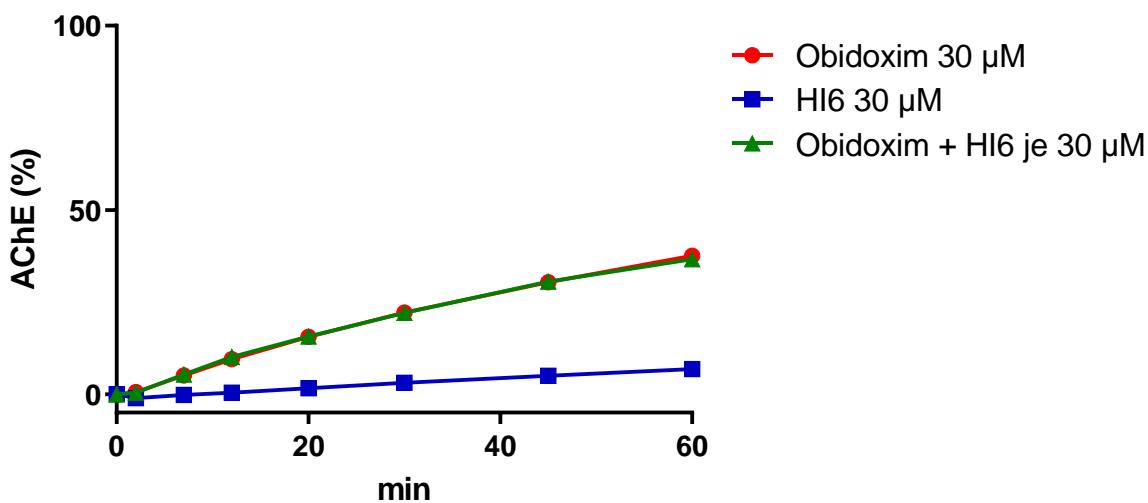


Abb. 29. Zeitabhängige Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Oximblanks wurden von den gemessenen Werten abgezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 2).

Auch bei unterschiedlichen Konzentrationen war Obidoxim (10 µM) ein stärkerer Reaktivator Fenamiphos-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase als HI-6 (40 µM). Beide reaktivierten allerdings nur schwach. Einen sehr leichten Reaktivierungsvorteil brachte die Kombination von Obidoxim (10 µM) mit HI-6 (40 µM) im Vergleich zur alleinigen Obidoximgabe (10 µM). Alle Reaktivierungskurven zeigten einen monophasischen Anstieg (siehe Abbildung 30).

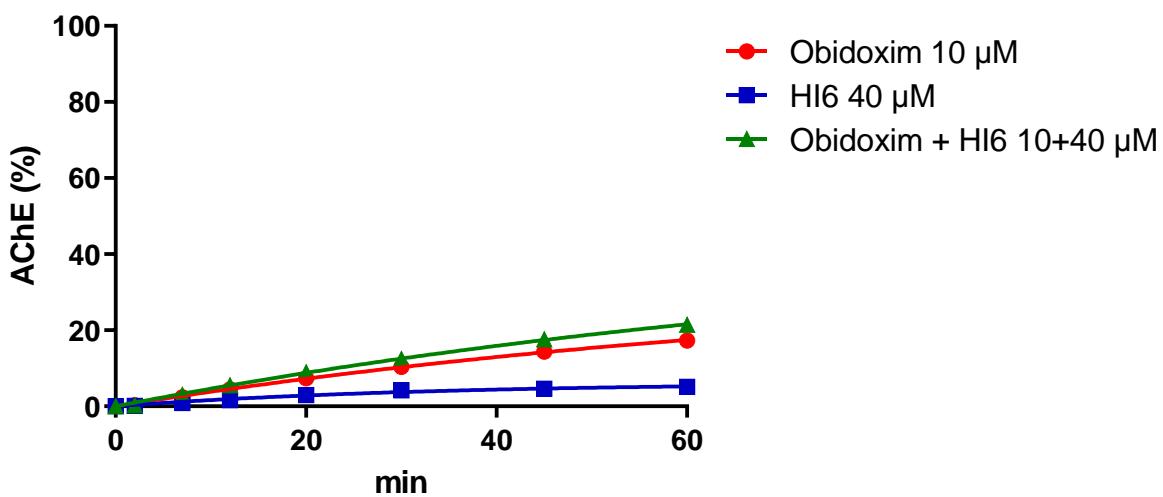


Abb. 30. Zeitabhängige Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (10 µM; rot), HI-6 (40 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (10 µM + 40 µM; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 2).

3.3.2 Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase

Die Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase (siehe Abbildung 31) lieferte sowohl für Obidoxim (30 µM) als auch für HI-6 (30 µM) vergleichbare Ergebnisse. Beide reaktivierten die Acetylcholinesterase nur sehr schwach. Nach 20 Minuten war im Wesentlichen kein Reaktivierungsanstieg mehr zu verzeichnen. Die Kombinationsgabe von Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) verbesserte die Reaktivierung, die Reaktivierung blieb aber stets unter 20%.

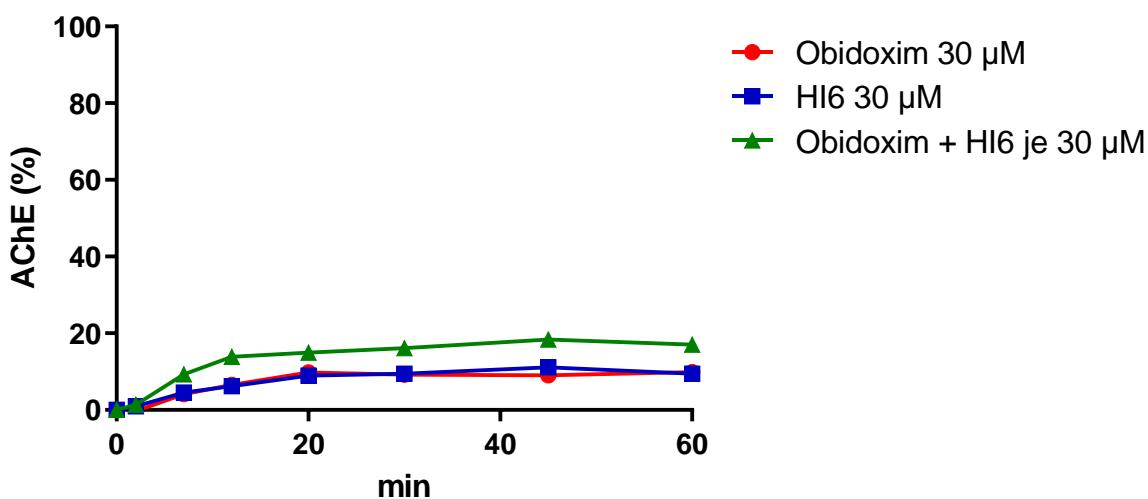


Abb. 31. Zeitabhängige Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 2).

Bei der Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase (siehe Abbildung 32) zeigten sich für Obidoxim (30 μ M) und Obidoxim und HI-6 (je 30 μ M) vergleichbare Kurven. Die Reaktivierung verlief langsam und pendelte sich auf niedrigem Niveau ein. Noch schwächer war die Reaktivierung durch HI-6 (30 μ M).

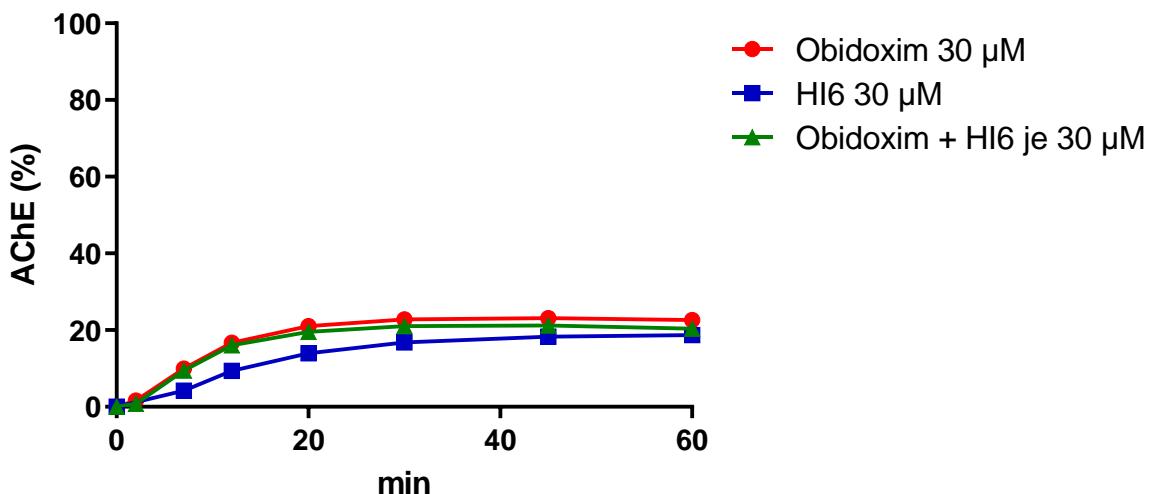


Abb. 32. Zeitabhängige Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter, verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 μ M; rot), HI-6 (30 μ M; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 μ M + 30 μ M; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben (Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 2).

3.4 Bestimmung der Reaktivierungskonstante k_{obs}

Um das Reaktivierungspotential von Obidoxim, HI-6 bzw. der Kombination von Obidoxim und HI-6 gegenüber den verwendeten Organophosphat-Insektiziden nicht nur rein deskriptiv darzustellen, sondern auch zu quantifizieren, wurden die k_{obs} -Werte sowohl mittels linearer als auch mittels nicht-linearer Regressionsanalyse bestimmt.

3.4.1 Bestimmung von k_{obs} am Beispiel der Reaktivierung unverdünnter PXE-gehemmter humaner Acetylcholinesterase

Lineare Regression

Für die lineare Regressionsanalyse wurde der Terminus $\ln\left(\frac{v_0-v_t}{v_0-v_i}\right)$ zum jeweiligen Zeitpunkt berechnet und gegenüber der Zeit t aufgetragen (siehe Abbildung 33).

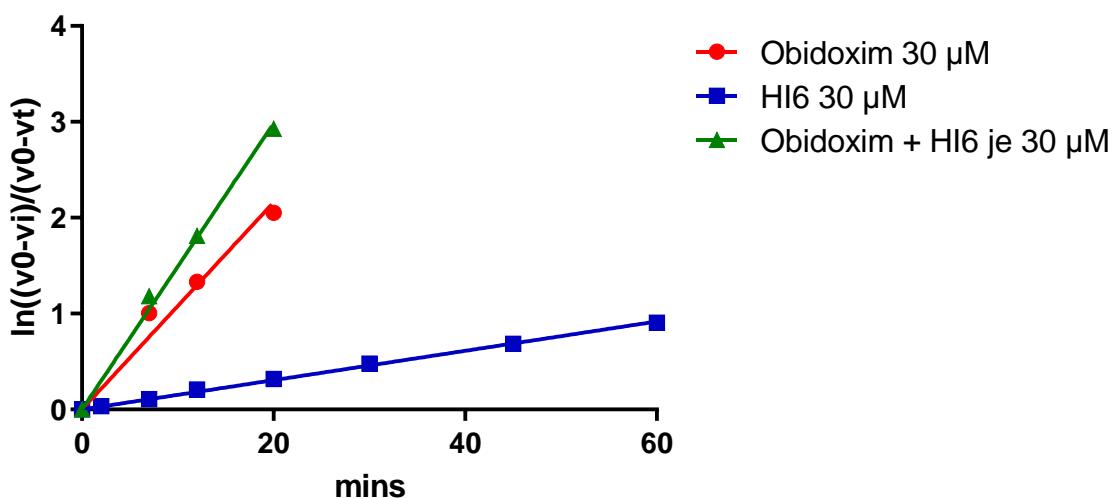


Abb. 33. Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-ethyl-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 μM ; rot), HI-6 (30 μM ; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 μM + 30 μM ; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten wurden mittels linearer Regression analysiert, um k_{obs} zu erhalten (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 2$).

In diesem Beispiel konnten für Obidoxim und Obidoxim+HI-6 nur die Messwerte bis 20 min verwendet werden, da bei weiteren Zeitpunkten kein linearer Anstieg mehr stattfand. Ein Schneiden der Geraden durch den Ursprung wurde erzwungen. Die Steigung der Geraden lieferte k_{obs} . In diesem Fall entsprach k_{obs} (min^{-1}) für Obidoxim (30 μM) 0,1081, für HI-6 (30 μM) 0,0153, für die Kombination aus Obidoxim und HI-6 (je 30 μM) 0,1493.

Nicht lineare Regression

Es wurde die Aktivität der Acetylcholinesterase zum jeweiligen Zeitpunkt nach folgender Formel bestimmt: $\%reactivation_t = \left(\frac{(AIR_t - AR) - AI}{A - AI} \right) \times 100$

Abbildung 34 ergibt sich aus der Auftragung der Aktivität gegenüber der Zeit und anschließender nicht-linearer Regressionsanalyse.

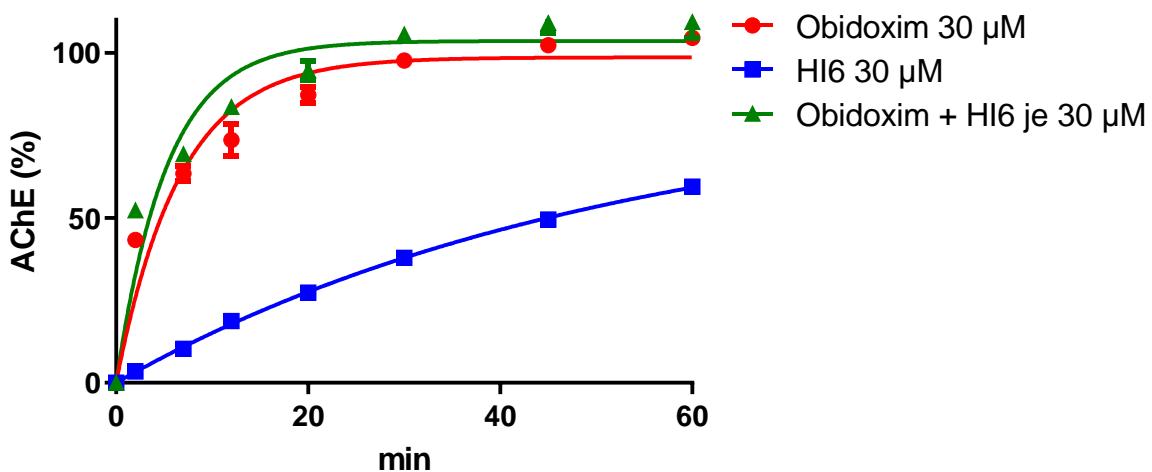


Abb. 34. Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-ethyl-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 μ M; rot), HI-6 (30 μ M; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 μ M + 30 μ M; grün). Die Acetylcholinesterase wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und auf die Aktivität der Kontrolle bezogen. Die Daten werden in % Reaktivierung angegeben. Die Daten wurden mittels nicht-linearer Regression analysiert, um k_{obs} zu erhalten (Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 2).

Nach der Formel $vt = vo \times (1 - e^{-k_{obs} \times t})$ ergaben sich die k_{obs} -Werte. Für Obidoxim (30 μ M) betrug dieser 0,1510, für HI-6 (30 μ M) 0,0191, für die Kombination aus Obidoxim und HI-6 (je 30 μ M) 0,1894.

3.4.2 Bestimmung weiterer k_{obs} -Werte

Die Bestimmung der k_{obs} -Werte für die Reaktivierung weiterer OP-gehemmter Acetylcholinesterase durch Obidoxim, HI-6 und der Kombination aus Obidoxim und HI-6 folgte im Prinzip dem oben beschriebenen Beispiel. Aus Gründen mangelnder Linearität konnten bei linearer Regressionsanalyse teilweise nur die ersten Werte für die Bestimmung der k_{obs}

herangezogen werden. Bei den Versuchen mit verdünnter Acetylcholinesterase, welche durch Dimethyl-Insektizide gehemmt wurde, zeigte sich nach Erreichen eines Reaktivierungsmaximums ein Rückgang in der Reaktivierung. Für die Bestimmung der Konstante k_{obs} durch nicht-lineare Regressionsanalyse wurden lediglich die Reaktivierungswerte bis zum Erreichen des Maximums berücksichtigt. Tabelle 11 stellt die gewonnenen k_{obs} -Werte (min^{-1}) für die Reaktivierung OP-gehemmter Acetylcholinesterase mit jeweils 30 μM Oxim bzw. Oximkombination dar. Tabelle 12 zeigt die k_{obs} -Werte bei Reaktivierung PXE und Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase mit 10 μM Obidoxim, 40 μM HI-6 sowie Obidoxim und HI-6 (10 μM +40 μM).

Tabelle 11

k_{obs} -Werte für Obidoxim (30 μM), HI-6 (30 μM) und die Kombination aus Obidoxim und HI-6 (je 30 μM) für die Reaktivierung unverdünnter und verdünnter OP-gehemmter Acetylcholinesterase

Stoffe	Linear			Nicht-linear		
	Obidoxim	HI-6	Kombination	Obidoxim	HI-6	Kombination
Diethyl						
PXE						
unverdünnt	0.1081	0.0153	0.1493	0.1510	0.0191	0.1894
verdünnt	0.7573	0.0109	0.3117	0.8942	0.0170	0.4736
Dimethyl						
PXM						
unverdünnt	0.1731	0.0118	0.1692	0.2428	0.0532	0.2440
verdünnt	0.4552	0.0087	0.3222	0.6408	0.0267	0.5360
Andere						
Fenamiphos						
unverdünnt	0.0072	0.0011	0.0077	0.0185	0.0091	0.0170
verdünnt	0.0086	0.0015	0.0085	0.0107	0	0.0129
Ethoprophos						
unverdünnt	0.0092	0.0835	0.0165	0.0875	0.0812	0.1046
verdünnt	0.0150	0.0077	0.0143	0.0908	0.0520	0.0957

Alle Zahlenwerte wurden auf 4 Nachkommastellen gerundet.

Tabelle 12

k_{obs} -Werte für Obidoxim (10 μM), HI-6 (40 μM) und die Kombination aus Obidoxim und HI-6 (10 μM + 40 μM) bei unverdünnter PXE- und Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase

Stoffe	Linear			Nicht linear		
	Obidoxim	HI-6	Kombination	Obi	HI-6	Kombination
Diethyle						
PXE	0.0524	0.0158	0.0743	0.0790	0.0209	0.0888
Andere						
Fenamiphos	0.0033	0.0009	0.0041	0.0118	0.0305	0.0109

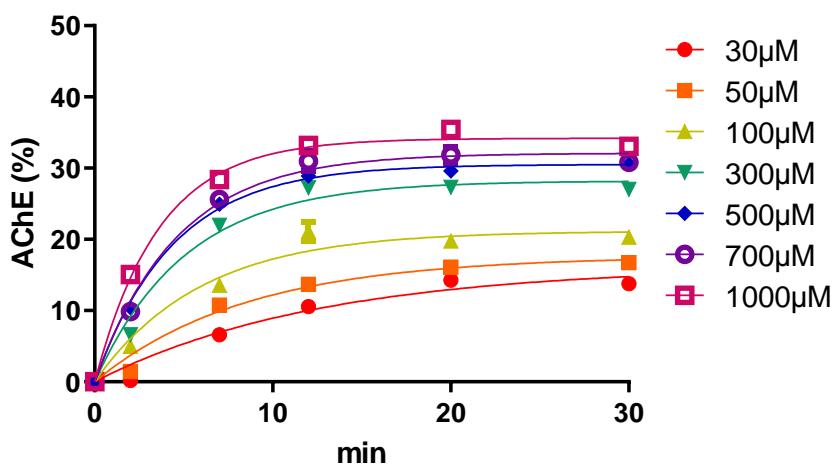
Alle Zahlenwerte wurden auf 4 Nachkommastellen gerundet.

3.5 Bestimmung übergeordneter Reaktivierungskonstanten am Beispiel von Ethoprophos

3.5.1 Nicht-lineare Regression: Reaktivierung von Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase mit Obidoxim und HI-6

Die Analyse der Daten durch nicht lineare Regressionsanalysen lieferte eine relativ gute Anpassung. Durch Verwendung der Gleichung $vt = v_0 \times (1 - e^{-k_{obs} \times t})$ konnte K_{obs} für die jeweiligen Konzentrationen ermittelt werden.

a)



b)

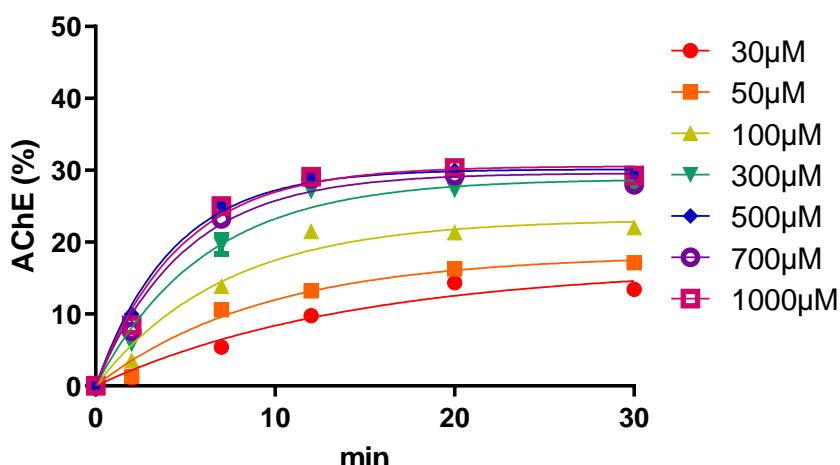
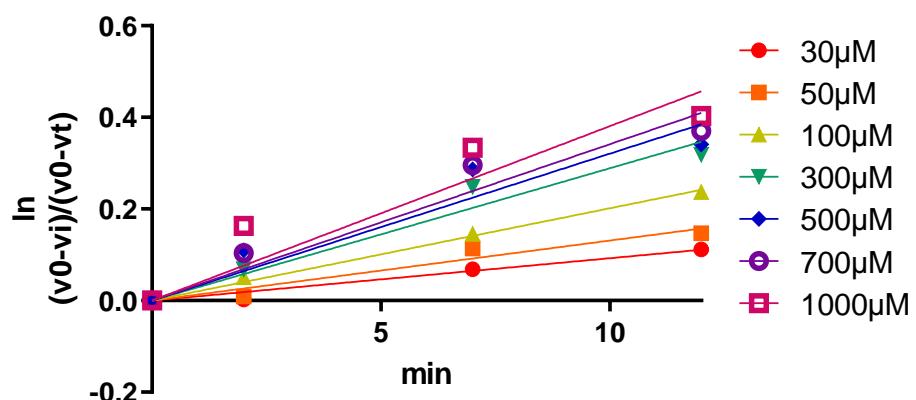


Abb. 35 a+b. Zeit- und konzentrationsabhängige Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter menschlicher Acetylcholinesterase durch Obidoxim (a) und HI-6 (b). Ethoprophos-gehemmte menschliche Acetylcholinesterase wurde mit 30, 50, 100, 300, 500, 700 und 1000 μM Obidoxim (a) bzw. HI-6 (b) inkubiert und die Acetylcholinesteraseaktivität wurde nach 2, 7, 12, 20, 30 min bestimmt. Die Daten wurden mittels nicht-linearer Regression analysiert, um k_{obs} zu erhalten.

3.5.2 Lineare Regression: Reaktivierung von Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase mit Obidoxim und HI-6

Ein Schneiden der Gerade mit dem Ursprung wurde erzwungen. Die Anpassung war insbesondere in hohen Konzentrationsbereichen deutlich schlechter als bei der nicht-linearen Regression.

a)



b)

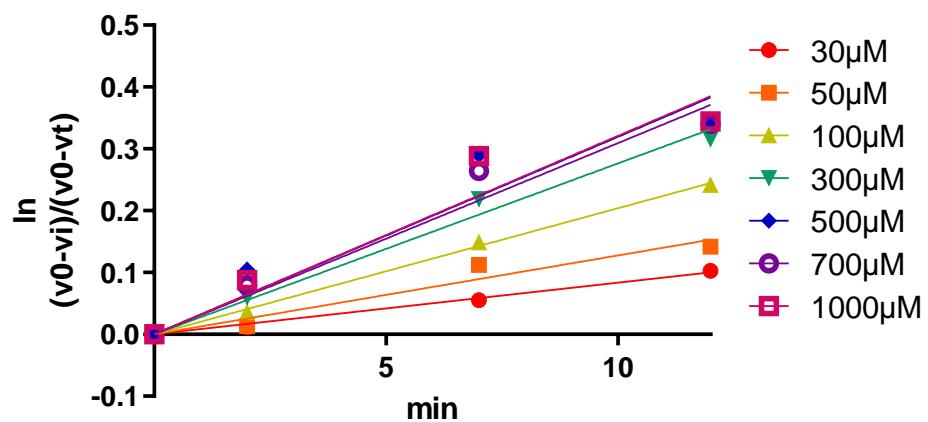


Abb. 36 a+b. Zeit- und konzentrationsabhängige Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter menschlicher Acetylcholinesterase durch Obidoxim (a) und HI-6 (b). Ethoprophos-gehemmte menschliche Acetylcholinesterase wurde mit 30, 50, 100, 300, 500, 700 und 1000 μM HI-6 inkubiert und die Acetylcholinesteraseaktivität wurde nach 2,7 und 12 min bestimmt. Die Daten wurden mittels linearer Regression analysiert, um k_{obs} zu erhalten.

3.5.3 Bestimmung von k_r , K_D und k_{r2}

Die graphische Darstellung der k_{obs} -Werte gegenüber den verwendeten Oximkonzentrationen lieferte die Reaktivierungskonstanten K_D und k_r . Berücksichtigt wurden nur die k_{obs} -Werte, welche aus der linearen Regressionsanalyse gewonnen wurden. Die Kurven für Obidoxim und HI-6 unterschieden sich für niedrigere Konzentrationen nur unwesentlich. Im höheren Konzentrationsbereich wies Obidoxim höhere k_{obs} -Werte als HI-6 auf.

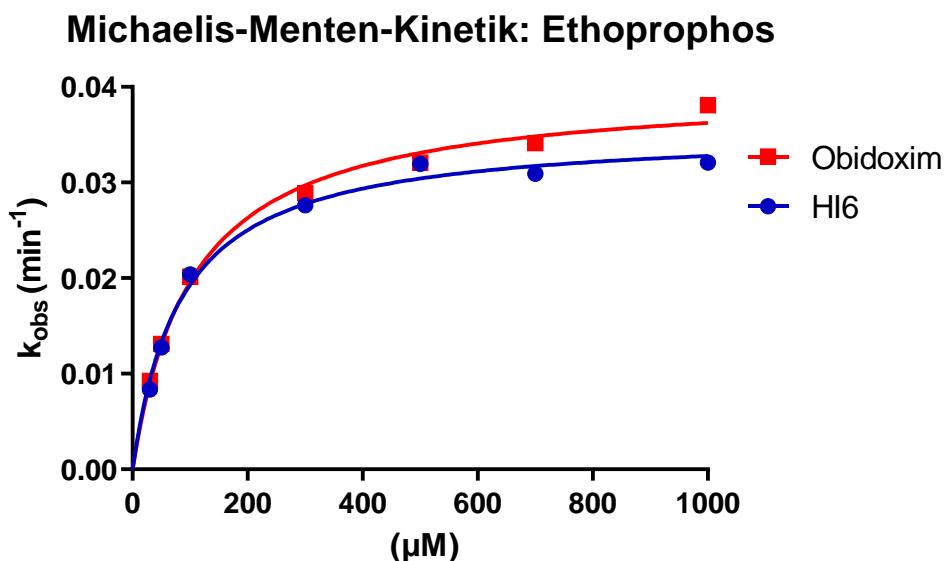


Abb. 37. Michaelis-Menten-Kinetik für Ethoprophos: Die graphische Darstellung, der aus Abbildung 36 gewonnen k_{obs} -Werte gegenüber der verwendeten Konzentration an Obidoxim (rot) bzw. HI-6 (blau) ermöglichte die Berechnung der Reaktivierungskonstanten K_D und k_r .

Die nicht-lineare Regressionsanalyse lieferte für Obidoxim und HI-6 sowohl für die K_D als auch k_r vergleichbare Werte. Die K_D -Werte fielen bei linearer Regressionsanalyse leicht höher aus, die k_r -Werte geringer verglichen mit den Werten der nicht linearen Regressionsanalyse. Auch lagen die K_D -Werte für Obidoxim über denen für HI-6 (siehe Tabelle 13). Die Reaktivierungskonstanten konnten nun verwendet werden, um die theoretische Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase zu bestimmten Zeitpunkten und Ethoprophos-Konzentrationen nach Gleichung (4) zu berechnen. k_{r2} wurde nach der Gleichung (6) ermittelt.

Tabelle 13

Reaktivierungskonstanten für Oxim-induzierte Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter menschlicher Acetylcholinesterase mit nicht-linearer und linearer Regressionsanalyse

Oxim	K_D (μM)	k_r (min^{-1})	k_{r2} (mM^{-1} min^{-1})	K_D (μM)	k_r (min^{-1})	k_{r2} (mM^{-1} min^{-1})
	nicht-linear	nicht-linear	min^{-1})	Linear	linear	min^{-1})
	linear	linear	nicht-linear			linear

Obidoxim 64.73 0.2602 4,02 104.2 0.0400 0,38

HI-6 64.77 0.2298 3,55 84.01 0.0355 0,42

Die Zahlenwerte wurden auf 4 Nachkommastellen gerundet.

3.6 Hemmung der Acetylcholinesterase durch verwendete Oxime

Die Hemmung der Acetylcholinesterase durch die verwendeten Oxime in unterschiedlichen Konzentrationen zeigte eine schwache Hemmung durch Obidoxim sowie eine stärkere Hemmung durch HI-6 bzw. die Kombination aus HI-6 und Obidoxim. Die genauen Hemmwerte können der Tabelle 14 entnommen werden.

Tabelle 14

Hemmung humaner, unverdünnter Acetylcholinesterase mit Obidoxim, HI-6 und der Kombination aus Obidoxim und HI-6 in verwendeten Oximkonzentrationen

Oxim	Hemmung in %
Obidoxim	
10 μM	5.5
30 μM	5.9
HI-6	
30 μM	20.7
40 μM	23.7
Obidoxim + HI-6	
30 μM + 30 μM	23.2
10 μM + 40 μM	25.2

4. DISKUSSION

4.1 Reaktivierung Diethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase

Als Leitsubstanz für Insektizide, welche mit der Acetylcholinesterase einen Diethylphosphoryl-Komplex bilden, wurde Paraoxon-ethyl gewählt. Wie bei Paraoxon-ethyl handelt es sich auch bei Chlorpyrifos-oxon um ein Diethyl-Organophosphat. Anhand von Abbildung 6 erkennt man, dass es bei der Hemmung der Acetylcholinesterase zur Abspaltung der Abgangsgruppe kommt. Beide Substanzen unterscheiden sich lediglich in ihrer Abgangsgruppe und bilden demnach beide mit der Acetylcholinesterase einen Diethylphosphoryl-Komplex.

Die Abbildungen 14 und 17 zeigen, dass HI-6 ein schwacher Reaktivator Diethyl-gehemmter Acetylcholinesterase ist. Die Einzelgabe von Obidoxim ($30 \mu\text{M}$) führte zu einem raschen, biphasischen Anstieg der Acetylcholinesterase-Aktivität. Die Zugabe von HI-6 ($30 \mu\text{M}$) zeigte einen ähnlichen Verlauf, jedoch verbesserte sich die Reaktivierung leicht. Der biphasische Verlauf ist gekennzeichnet durch einen anfänglich zügigen, später langsameren Anstieg der Acetylcholinesterase-Aktivität. Dies lässt sich durch das während der Reaktivierungsreaktion gebildete phosphorylierte Oxim (= POX) erklären. POX wiederum kann die bereits reaktivierte Acetylcholinesterase hemmen (Luo et al. 1999). Ein biphasischer Verlauf und somit der Hinweis auf gebildetes, stabiles POX zeigte sich bei Einzelgabe des Oxims Obidoxim oder der Kombinationsgabe von Obidoxim und HI-6. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen bisheriger Studien. Demnach wird stabiles POX gebildet, wenn das verwendete Oxim die Oxim-Gruppe an Position 3 oder 4 des Pyridiniumrings trägt (z. B. Obidoxim). Im Gegensatz dazu ist gebildetes POX äußerst instabil bei Verwendung eines Oxims, welches seine Oxim-Gruppe an Position 2 des Pyridiniumrings (z. B. HI-6) trägt (Worek et al., 2000; Ashani et al., 2003; Kiderlen et al., 2005; Stenzel et al., 2007). Die Bedeutung dieses in-vitro festgestellten POX-Effektes für einen Organophosphat-vergifteten Patienten bleibt bis heute unklar (Eyer und Worek 2007). Wenn man die von Aldridge und Reiner aufgestellte Formel $[EP] + [OX] \rightleftharpoons [EPOX] \rightleftharpoons [E] + [POX]$ betrachtet, erkennt man, dass die Menge des gebildeten POX und damit auch die Stärke möglicher Hemmung durch POX nicht nur abhängig von der Oximkonzentration, sondern auch von der Konzentration des vorhandenen Enzyms ist (Aldridge und Reiner 1972).

Die Enzymkonzentration wurde durch 100-fache Verdünnung im Ansatz reduziert und somit die Menge des gebildeten POX minimiert. Die Abbildungen 15 und 18 zeigen die sich ergebende Reaktivierungs-Grafiken bei Verwendung verdünnter Acetylcholinesterase. Berücksichtigt werden musste bei den Verdünnungsversuchen die höhere Konzentration von Oxim in der Messküvette im Vergleich zu den unverdünnten Versuchen. Hohe Oximkonzentrationen führen durch Spaltung des Substrates zu einem vermeintlichen Anstieg der Acetylcholinesteraseaktivität (= Oximblank) (Worek et al. 2012).

Der Verdünnungsversuch zeigte für die einzelne Obidoximgabe ($30 \mu\text{M}$) sowie für die Kombinationsgabe von Obidoxim und HI-6 (je $30 \mu\text{M}$) – im Gegensatz zum unverdünnten Versuch – einen nahezu monophasischen und insgesamt schnelleren Anstieg der Enzymaktivität. Dies spricht dafür, dass der POX-Effekt für Obidoxim weitestgehend beseitigt werden konnte. Für HI-6 zeigte sich auch bei Verdünnung des Enzyms ein monophasischer Anstieg, d. h. gebildetes POX war instabil und beeinflusste die Reaktivierung wenig.

Weiterhin fiel auf, dass bei den unverdünnten Versuchen (siehe Abbildungen 14 und 17) die Kombinationsgabe (je $30 \mu\text{M}$) gegenüber der Obidoximeinzelgabe ($30 \mu\text{M}$), bei den verdünnten Versuchen (siehe Abbildungen 15 und 18) jedoch die Obidoximeinzelgabe ($30 \mu\text{M}$) der Kombinationsgabe (je $30 \mu\text{M}$) leicht überlegen war. Vergangene Studien haben gezeigt, dass Oxime als reversible Inhibitoren zu einer konzentrationsabhängigen, kompetitiven und nicht-kompetitiven Hemmung der Acetylcholinesterase führen können (Zech 1969). Dies geschieht vermutlich durch Bindung sowohl des katalytischen als auch des allosterischen Zentrums (Franciskovic et al. 1993). Wie Tabelle 14 zeigt, ist Obidoxim ($30 \mu\text{M}$) ein wesentlich schwächerer Inhibitor der Acetylcholinesterase (5,9% Hemmung) als HI-6 ($30 \mu\text{M}$; 20,7% Hemmung). Eine Kombination aus Obidoxim und HI-6 (je $30 \mu\text{M}$) erhöht das Hemmpotential geringfügig (23,2% Hemmung) verglichen mit der HI-6-Einzelgabe. Bei verdünnten Versuchen war die Konzentration des jeweiligen Oxims in der Messküvette ($9,52 \mu\text{M}$) wesentlich höher als bei unverdünnten Versuchen ($0,19 \mu\text{M}$), d. h. eine Hemmung durch Oxime fällt bei verdünnten Versuchen wesentlich schwerer ins Gewicht. So führt eine zusätzliche Gabe des ohnehin schon stärker hemmenden HI-6 zu Obidoxim (je $30 \mu\text{M}$) bei verdünnten Versuchen zu einer in der Summe schlechteren Reaktivierung als durch Obidoxim allein. Der Effekt hemmenden Oxims spielt dagegen eine untergeordnete Rolle bei unverdünnten Versuchen.

Unterschiedliche Konzentrationen von Obidoxim ($10 \mu\text{M}$) und HI-6 ($40 \mu\text{M}$) wurden gewählt, um abschätzen zu können, ob eine derartige Kombinationstherapie mit

unterschiedlicher Oximdosis sinnvoll ist (siehe Abbildungen 16 und 19). Die Anhebung der HI-6-Konzentration auf 40 µM und die Reduzierung der Obidoxim-Konzentration auf 10 µM zeigte eine geringere Reaktivierungsleistung im Vergleich zur verwendeten Standardkombination (je 30 µM). Dies ist damit zu erklären, dass Obidoxim ein wesentlich stärkerer Reaktivator Diethyl-gehemmter Acetylcholinesterase als HI-6 ist (vgl. Worek et al. 2004) und eine Anhebung der HI-6-Konzentration um 10 µM die Reduzierung der Obidoximkonzentration um 20 µM nicht abfangen kann. Auffallend war jedoch, dass eine Kombinationstherapie von Obidoxim und HI-6 (10 µM + 40 µM) im Vergleich zur Einzelgabe von Obidoxim (10 µM) deutlichere additive Effekte in der Reaktivierung des Enzyms erzielte, als dies bei Kombinationsgabe von Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) verglichen mit der Einzelgabe von Obidoxim (30 µM) der Fall war.

Obidoxim ist HI-6 bei der Reaktivierung Diethyl-gehemmter Acetylcholinesterase überlegen. Eine Kombinationstherapie aus HI-6 und Obidoxim in den verwendeten Konzentrationen erscheint im Vergleich zur Einzelverabreichung von Obidoxim – aus Sicht der reinen Reaktivierungsleistung – sinnvoll.

4.2 Reaktivierung Dimethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase

Als Leitsubstanz für Insektizide, welche mit der Acetylcholinesterase einen Dimethylphosphoryl-Komplex bilden, wurde Paraoxon-methyl gewählt. Auch Omethoat und Pirimiphos-methyl-oxon bilden wie Paraoxon-methyl mit der Acetylcholinesterase einen Dimethylphosphoryl-Komplex. Bei Dimethyl-Organophosphaten zeigte sich besonders eine durch spontane Hydrolyse (siehe Abbildung 6) hervorgerufene hohe Spontanreaktivierung (siehe Abbildung 21). Dies steht im Einklang mit einer Studie der Arbeitsgruppe Worek. PXM-gehemmte Acetylcholinesterase unterliegt einer schnellen Spontanreaktivierung ($k_s = 1.01 \text{ h}^{-1}$), PXE-gehemmte Acetylcholinesterase einer langsamen Spontanreaktivierung ($k_s = 0.022 \text{ h}^{-1}$). Fenamiphos-gehemmte Acetylcholinesterase zeigt keine wesentliche Spontanreaktivierung (Worek et al. 2004). Während die Spontanreaktivierung in dem – in dieser Studie – verwendeten Versuchs-Setup für Diethyl-OP-, Fenamiphos- und Ethoprophos-gehemmte Acetylcholinesterase vernachlässigbar war, musste diese für Versuche mit Dimethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase durch Messung des Hemmwertes über die Zeit und Verwendung dessen bei der Berechnung der Netto-Reaktivierung berücksichtigt werden.

Vergleicht man die Spontanreaktivierung unverdünnter (siehe Abbildung 21) mit der verdünnter Dimethyl-gehemmter (Abbildung 23) Acetylcholinesterase, so führt die Verdünnung zu einer geringfügig schnelleren und insgesamt geringfügig höheren Spontanreaktivierung.

Auch bei Dimethyl-gehemmter Acetylcholinesterase zeigte sich für Obidoxim (30 µM) und die Kombination von Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) ein biphasischer Reaktivierungsanstieg (siehe Abbildungen 20, 24 und 26). Dieser biphasische Anstieg konnte bei 100-facher Enzymverdünnung (siehe Abbildungen 23, 25 und 27) nicht mehr nachgewiesen werden. Auch ist die Reaktivierung bei Verdünnung mit Obidoxim (30 µM) und der Kombination von Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) schneller und es wird ein insgesamt höheres Reaktivierungsniveau erreicht. Der Effekt hemmenden phosphoryliertem Obidoxims konnte somit minimiert werden. Die Kombinationsgabe von Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) zeigte nahezu identische Reaktivierungskurven im Vergleich zur Obidoximeinzelgabe (30 µM). Obidoxim (30 µM) war HI-6 (30 µM) überlegen.

Ähnlich wie bei der Reaktivierung Diethyl-gehemmter Acetylcholinesterase konnte auch bei der Reaktivierung Dimethyl-gehemmter Acetylcholinesterase festgestellt werden, dass bei den unverdünnten Versuchen (siehe Abbildungen 20, 24 und 26) die Kombinationsgabe (je 30 µM) in etwa vergleichbar war mit der Obidoximeinzelgabe (30 µM), jedoch bei den verdünnten Versuchen (siehe Abbildungen 22, 25, und 27) die Obidoximeinzelgabe (30 µM) der Kombinationsgabe (je 30 µM) leicht überlegen war. Auch dies ist mit der bei verdünnten Versuchen erhöhten Oximkonzentration in der Messküvette und der damit einhergehenden erhöhten Oximhemmung zu erklären.

Bei Verdünnung der Acetylcholinesterase (siehe Abbildungen 22, 25 und 27) zeigte sich, nach Erreichen eines Reaktivierungsmaximums, ein Rückgang der Reaktivierungskurven. Dabei könnte es sich möglicherweise um ein rein mathematisches Phänomen handeln. Die Reaktivierung wird nach der Formel $\% reactivation_t = \left(\frac{(AIR_t - AR) - AI}{A - AI} \right) \times 100$ bestimmt. Während AIR_t (= Aktivität) im Reaktivierungsansatz nach wenigen Minuten nicht mehr stieg, d. h. ein Reaktivierungsmaximum erreicht war, oder aufgrund mangelnder Enzymstabilität sogar fiel, nahm AI (= Hemmwert über die Zeit) aufgrund Spontanreaktivierung kontinuierlich zu (siehe Abbildung 21 und 23). Dies führt zu einer scheinbaren Abnahme der Netto-Reaktivierung.

Insgesamt wurde im Vergleich zur Reaktivierung PXE-gehemmter Acetylcholinesterase ein geringeres Reaktivierungs niveau erreicht, was möglicherweise an einer schnelleren Alterung (siehe Abbildung 6) von Dimethyl-OP-gehemmten ($t_{1/2} = 3,7$ h) verglichen mit Diethyl-gehemmtem Enzym ($t_{1/2} = 32$ h) liegen könnte (Worek et al. 2004). Wie erwartet, war Obidoxim HI-6 bei der Reaktivierung Dimethyl-gehemmter Acetylcholinesterase überlegen. Eine Kombinationstherapie ergab keine additiven Effekte.

Kleinere Unterschiede in den Reaktivierungsgraphiken von Paraoxon-methyl-gehemmter, Omethoat-gehemmter und Pirimiphos-methyl-oxon-gehemmter Acetylcholinesterase Acetylcholinesterase könnten durch mögliche Verzerrungseffekte erklärt werden, da von jeweils unterschiedlichen Hemmwerten ausgegangen wurde, wodurch kleinere Messungenauigkeiten schwerer ins Gewicht fielen. So lag die Hemmung durch PXM nach Dialyse bei 87,3%, durch Omethoat bei 53,8% und durch Pirimiphos-methyl-oxon bei 50% (vergleiche Tabelle 7).

4.3 Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase

Die Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase zeigte sowohl für Obidoxim (30 μ M) als auch für die Kombination aus Obidoxim und HI-6 (30 μ M) einen monophasischen Reaktivierungsanstieg (siehe Abbildung 28). Die Reaktivierungskurven von unverdünntem und verdünntem Enzym unterschieden sich wenig (siehe Abbildung 29). Dies spricht dafür, dass ein möglicher POX-Effekt bei der Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase nicht bzw. nicht entscheidend auftritt. HI-6 (30 μ M) reaktivierte Fenamiphos-gehemmte Acetylcholinesterase kaum. Obidoxim (30 μ M) ist HI-6 (30 μ M) überlegen, reaktiviert die Acetylcholinesterase jedoch nur unzureichend, wenn davon ausgegangen werden kann, dass eine Enzymaktivität von 30% für die Normalisierung neuromuskulärer Funktionen erreicht werden muss und eine Enzymaktivität von unter 10% erhebliche Einschränkung neuromuskulärer Funktionen bedeutet (Thiermann et al. 2005).

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit vergangenen Studien. Verantwortlich für die schlechte Reaktivierbarkeit von Phosphoramidaten scheint im Fall von Fenamiphos die Isopropylamido-Gruppe zu sein, welche möglicherweise die Elektrophilie des Phosphoratoms reduziert und dieses somit für einen nukleophilen Angriff weniger zugänglich ist (Worek et al. 2004; Worek et al. 2007b).

Während bei unverdünntem Ansatz die Reaktivierungskurve für die Kombination (je 30 µM) geringfügig oberhalb der Reaktivierungskurve für Obidoxim (30 µM) verläuft, sind die Reaktivierungskurven ebendieser bei verdünntem Ansatz nahezu identisch. Auch dies lässt sich durch die bei verdünnten Versuchen erhöhte Oximkonzentration im Ansatz und einer damit einhergehenden erhöhten Oximhemmung erklären.

Eine Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) hat – auch bei Wahl anderer Oximkonzentrationen (siehe Abbildung 30) – keine wesentlichen Vorteile in Bezug auf die Reaktivierungsleistung.

4.4 Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase

Durch Ethoprophos-gehemmte Acetylcholinesterase war sowohl mit Obidoxim (30 µM) als auch mit HI-6 (30 µM) gleichermaßen schlecht reaktivierbar. Dies steht im Einklang mit bisherigen Ergebnissen (Worek et al. 2016a). Weder bei unverdünnter (siehe Abbildung 31) noch bei verdünnter (siehe Abbildung 32) Acetylcholinesterase zeigte sich ein biphasischer Reaktivierungsanstieg. Es fiel jedoch auf, dass nach einem initialen Reaktivierungsanstieg relativ schnell ein Plateau erreicht wurde. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine theoretisch angenommene schnelle Alterung Ethoprophos-gehemmter-Acetylcholinesterase sein (vergleiche Abbildung 6). Die Verdünnung verbesserte die Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase durch Obidoxim (30 µM) geringfügig. Es besteht somit kein sicherer Hinweis auf Hemmung durch gebildetes POX. Während bei unverdünntem Ansatz die Reaktivierungskurve der Kombination (je 30 µM) oberhalb der Reaktivierungskurve für Obidoxim (30 µM) liegt, verlaufen diese bei verdünntem Ansatz nahezu identisch. Dies ist am ehesten auf eine erhöhte Oximkonzentration im verdünnten Ansatz zurückzuführen.

HI-6 und Obidoxim sind sehr schwache Reaktivatoren Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase. Die Kombination aus Obidoxim und HI-6 (je 30 µM) ist der Einzelgabe von Obidoxim (30 µM) oder HI-6 (30 µM) geringfügig überlegen, stellt aber in Anbetracht einer nötigen Enzym-Reaktivierung von 30% keine zufriedenstellende Lösung dar (Thiermann et al. 2005).

4.5 Vergleich von k_{obs} -Werten

Neben dem Ausmaß der Reaktivierung der Acetylcholinesterase ist für die Gesamtbeurteilung der Reaktivierungsleistung einer Oximtherapie die Geschwindigkeit der Reaktivierung von Bedeutung. Um die anfängliche Geschwindigkeit der Reaktivierung zu quantifizieren, wurde die Konstante k_{obs} aufgestellt (siehe Tabelle 11). Um k_{obs} zu erhalten, wurde die zeitabhängige Reaktivierung OP-gehemmter Acetylcholinesterase sowohl mittels linearer als auch mittels nicht-linearer Regression analysiert. Bei linearer Regressionsanalyse ergab sich k_{obs} aus Gleichung 3 als Steigung der Geraden, die durch das Auftragen des Terminus $\ln\left(\frac{v_0-vt}{v_0-v_i}\right)$ gegenüber der Zeit t entsteht. Bei nicht-linearer Regressionsanalyse wurde k_{obs} aus Gleichung 4 berechnet: $vt = v_0 \times (1 - e^{-k_{obs} \times t})$. In beiden Fällen wurde die Aktivität ungehemmten Enzyms als Kontrollaktivität verwendet.

Höhere k_{obs} -Werte spiegeln dabei einen schnelleren Reaktivierungsablauf wider. Insgesamt fällt auf, dass die aus der linearen Regression gewonnenen Werte nahezu durchgehend geringer ausfielen, als diejenigen nicht-linearer Regression. Aufgrund mangelnder Linearität bereits nach wenigen Minuten konnten bei der linearen Regressionsanalyse oftmals nur die ersten Werte berücksichtigt werden. Zudem musste ein Schneiden durch den Ursprung erzwungen werden, weshalb die k_{obs} -Werte der nicht-linearen Regressionsanalyse aussagekräftiger erscheinen und auf diese im Folgenden Bezug genommen wird.

4.6 POX-Effekt

Vergleicht man die k_{obs} -Werte verdünnter und unverdünnter Ansätze, so fällt auf, dass für Obidoxim als auch die Kombination aus Obidoxim und HI-6 die Werte der verdünnten Ansätze für Diethyle und Dimethyle nahezu durchgehend höher ausfallen, während die Werte für HI-6 in der Regel gleichbleiben, unabhängig davon, ob die Werte durch lineare oder nicht-lineare Regressionsanalyse erhalten wurden. So liegt z. B. der k_{obs} -Wert für PXE-gehemmte unverdünnte Acetylcholinesterase, die durch Obidoxim reaktiviert wurde, bei 0.1510 min^{-1} , nach Verdünnung bei 0.8942 min^{-1} . Demgegenüber ändert sich k_{obs} für HI-6 von 0.0191 min^{-1} (unverdünnt) auf 0.0170 min^{-1} (verdünnt) nur geringfügig. Dies spricht dafür, dass bei der Reaktivierung Diethyl- oder Dimethyl-gehemmter Acetylcholinesterase mit Obidoxim durch

Verdünnung die Re-Inhibierung durch phosphoryliertes Obidoxim minimiert werden konnte. Betrachtet man die k_{obs} -Werte für die Reaktivierung Fenamiphos- und Ethoprophos- gehemmter unverdünnter Acetylcholinesterase durch Obidoxim oder die Kombination aus Obidoxim und HI-6 mit den Werten nach Verdünnung, so kann kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Somit besteht kein Hinweis auf Re-Inhibierung durch phosphoryliertes Obidoxim bei der Reaktivierung Fenamiphos- oder Ethoprophos- gehemmter unverdünnter Acetylcholinesterase.

4.7 Vergleich der Kombinationstherapie mit der Obidoximeinzeltherapie

Vergleicht man die Effektivität einer Kombinationstherapie gegenüber der Einzeltherapie, so ist es sinnvoll, sich auf die Versuche mit unverdünnter Acetylcholinesterase zu beziehen, da diese die in-vivo-Situation zu imitieren versuchen. Eine 100-fache Enzymverdünnung zur Reduzierung des POX-Effektes ist in-vivo nicht denkbar. Im Folgenden wird deshalb auf die k_{obs} -Werte aus unverdünnten Versuchen Bezug genommen.

Die Reaktivierung PXE-gehemmter Acetylcholinesterase mittels der Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 ($k_{obs} = 0.1894 \text{ min}^{-1}$) liefert sehr ähnliche Werte für die Reaktivierungskonstante k_{obs} verglichen mit der Obidoxim-Einzeltherapie ($k_{obs} = 0.1510 \text{ min}^{-1}$). Die Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 bringt somit keinen wesentlichen Vorteil bei der Reaktivierung Diethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase verglichen mit Obidoximeinzeltherapie.

Auch die k_{obs} -Werte für die Reaktivierung PXM-gehemmter Acetylcholinesterase durch die Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 ($k_{obs} = 0.2428 \text{ min}^{-1}$) und durch die Einzeltherapie mit Obidoxim ($k_{obs} = 0.2440 \text{ min}^{-1}$) liegen sehr nah beieinander. Eine Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 bringt daher auch keinen Vorteil bei der Reaktivierung Dimethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase im Vergleich zur Obidoximeinzeltherapie.

Die Reaktivierung der Acetylcholinesterase, welche durch das Phosphoramidat Fenamiphos gehemmt wurde, mittels der Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 ($k_{obs} = 0.0170 \text{ min}^{-1}$) bringt keinen Vorteil in Bezug auf die Reaktivierungsleistung im Vergleich zur Einzeltherapie mit Obidoxim ($k_{obs} = 0.0185 \text{ min}^{-1}$).

Eine Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 liefert vergleichbare k_{obs} -Werte für die Reaktivierung der Acetylcholinesterase, welche durch das Phosphorodithioat Ethoprophos

gehemmt wurde, ($k_{obs} = 0.1046 \text{ min}^{-1}$) im Vergleich zur alleinigen Obidoximgabe ($k_{obs} = 0.0875 \text{ min}^{-1}$).

Festzuhalten bleibt, dass sich die k_{obs} -Werte für die Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 bei der Reaktivierung sowohl Dieethyl-, Dimethyl, Fenamiphos- als auch Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase im Wesentlichen nicht von denen der Obidoximeinzeltherapie unterscheiden. D. h. eine Kombinationstherapie hat keinen negativen Effekt auf die Reaktivierung der Acetylcholinesterase, welche durch die verwendeten Insektizid-Organophosphate gehemmt wurde, verglichen mit der Obidoximeinzeltherapie.

4.8 Vergleich unterschiedlicher Oximkonzentrationen

Für die Reaktivierung PXE- und Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase wurden zusätzlich zu den verwendeten Standardoximkonzentrationen (Obidoxim und HI-6 je 30 μM) Obidoxim (10 μM) und HI-6 (40 μM) in unterschiedlichen Konzentrationen getestet.

Die Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 (10 μM + 40 μM ; $k_{obs} = 0.0888 \text{ min}^{-1}$) verbessert die Reaktivierung PXE-gehemmter Acetylcholinesterase im Vergleich zur alleinigen Obidoximtherapie leicht (10 μM ; $k_{obs} = 0.0790 \text{ min}^{-1}$). Die Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 (10 μM + 40 μM) hat somit auch bei Verwendung unterschiedlicher Oximkonzentrationen für die Reaktivierung Diethyl-OP-gehemmter Acetylcholinesterase verglichen mit Obidoximeinfachtherapie (10 μM) keinen negativen Effekt.

Auch für die Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase hat die Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 (10 μM + 40 μM ; $k_{obs} = 0.0109 \text{ min}^{-1}$) keinen Nachteil im Vergleich zur Obidoximeinzeltherapie (10 μM ; $k_{obs} = 0.0118 \text{ min}^{-1}$).

Vergleicht man die Kombinationstherapien unterschiedlicher Oximkonzentrationen untereinander, so erkennt man allerdings, dass bereits eine Obidoximeinzeltherapie mit 30 μM der Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 (10 μM + 40 μM) bei der Reaktivierung Dimethyl-gehemmter Acetylcholinesterase überlegen ist. D. h. im Umkehrschluss, dass in einigen Fällen von Insektizid-Organophosphatvergiftungen eine Erhöhung der Obidoximdosis einen therapeutischen Vorteil bringen könnte, während eine Erhöhung der HI6-Dosis relativ geringe Auswirkungen haben dürfte.

4.9 Bestimmung übergeordneter Reaktivierungskonstanten am Beispiel von Ethoprophos

Reaktivierungskinetiken können sowohl mittels kontinuierlicher Methode (Kitz et al. 1965; Worek et al. 2002) als auch mittels diskontinuierlicher Methode (Worek et al. 2004) ermittelt werden. Zweitere Methode ist geeignet für Oxime mit niedriger Affinität und moderater Reaktivität (Worek et al. 2010), wie z. B. Obidoxim und HI-6 für Ethoprophos-gehemmte Acetylcholinesterase, und wurde deshalb verwendet. Die zeit- und konzentrationsabhängige Reaktivierung Insektizid-OP-gehemmter Acetylcholinesterase wurde mittels nicht linearer (siehe Abbildung 36) und linearer Regression (siehe Abbildung 37) analysiert. Die Anpassung verschlechterte sich bei linearer Regression insbesondere im hohen Oxim-Konzentrationsbereich, da aufgrund des Übergangs in ein Plateau keine Linearität mehr gegeben war. Die nicht-lineare Regressionsanalyse zeigte dagegen auch bei hohen Oximkonzentrationen eine gute Anpassung. Die verschiedenen Analysemethoden führten zu deutlichen Unterschieden in den Reaktivierungskonstanten (siehe Tabelle 13). Die lineare Regression liefert höhere Werte für K_D und niedrigere Werte für k_r , was insgesamt zu einem niedrigeren Wert für die Reaktionskonstante k_{r2} führt. Durch nicht-lineare Regression erhält man eine k_{r2} von $4,02 \text{ (mM}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$ für Obidoxim und $3,55 \text{ (mM}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$ für HI-6. Durch lineare Regression erhält man eine k_{r2} von $0,38 \text{ (mM}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$ für Obidoxim und $0,42 \text{ (mM}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$ für HI-6. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Werte könnte sein, dass bei der linearen Regressionsanalyse aufgrund mangelnder Linearität nicht alle Messwerte berücksichtigt werden konnten, während bei nicht-linearer Regressionsanalyse alle Messwerte berücksichtigt wurden. Ein weiterer wesentlicher Punkt ist, dass bei der nicht-linearen Regressionsanalyse das Y_{\max} , welches in etwa 30% entspricht, mit in die Berechnung einfließt. Dadurch erhält man bei nicht-linearer Regressionsanalyse falsch hohe K_D und K_r -Werte.

Tabelle 15 zeigt die Reaktivierungskonstanten von HI-6 und Obidoxim gegenüber OP-vergifteter Acetylcholinesterase für die verwendeten Insektizide (Worek et al 2004). Obidoxim und HI-6 weisen in etwa ähnliche Reaktivierungskonstanten für die Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase auf. Im Vergleich zu den übrigen verwendeten Insektiziden erkennt man eine mittlere Affinität und eine niedrige Reaktivität, was zur insgesamt schlechten Reaktivierbarkeit von Ethoprophos-gehemmter Acetylcholinesterase gleichermaßen sowohl durch Obidoxim, als auch durch HI-6 führt. PXE kann als Leitsubstanz

für Diethyle, PXM als Leitsubstanz für Dimethyle gelten. PXE-gehemmte Acetylcholinesterase lässt sich aufgrund vergleichsweise hoher Affinität gut durch Obidoxim ($K_D = 32.2 \pm 6,9 \mu\text{M}$) und aufgrund schlechterer Affinität nur unzureichend durch HI-6 reaktivieren ($K_D = 548.4 \pm 46 \mu\text{M}$). Die bessere Reaktivierbarkeit PXM-gehemmter Acetylcholinesterase durch Obidoxim ist bei in etwa gleicher Affinität vor allem in der höheren Reaktivität ($k_r = 4.24 \text{ min}^{-1}$) im Vergleich zu HI-6 ($k_r = 0.09 \text{ min}^{-1}$) begründet. Niedrige Affinität und schlechte Reaktivität führen zu einer allgemein schlechten Reaktivierbarkeit Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase, wobei Obidoxim HI-6 leicht überlegen ist.

Tabelle 15

Reaktivierungskonstanten für Oxim-induzierte Reaktivierung OP-gehemmter menschlicher Acetylcholinesterase

OP	R_1	R_2	Konstanten	Obidoxim	HI-6
PXE	OC_2H_5	OC_2H_5	$k_r (\text{min}^{-1})$	$*0.81 \pm 0.08$	$*0.2 \pm 0.009$
			$K_D (\mu\text{M})$	$*32.2 \pm 6,9$	$*548.4 \pm 46$
PXM	OCH_3	OCH_3	$k_r (\text{min}^{-1})$	$*4.24$	$*0.09$
			$K_D (\mu\text{M})$	$*163$	$*155$
Fenamiphos	OC_2H_5	$\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$	$k_r (\text{min}^{-1})$	$*0.09 \pm 0.02$	$*0.02 \pm 0.003$
			$K_D (\mu\text{M})$	$*615 \pm 272$	$*889 \pm 383$
Ethoprophos	OC_2H_5	SC_3H_7	$k_r (\text{min}^{-1})$	0.0400	0.0355
			$K_D (\mu\text{M})$	104.2	84.01

*Werte aus Worek et al. 2004

4.10 Limitationen und Ausblick

In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurde eine Unmenge an neuen Oximen entwickelt (Worek et al. 2007c; Kalisiak et al. 2011; Kuca et al. 2018; Kim et al. 2018; Gorecki et al. 2019). Trotz immensen Aufwandes in Wissenschaft und Forschung steht derzeit kein Oxim in Aussicht, welches die Vergiftungen mit einer großen Bandbreite von Organophosphaten abdeckt. Die Kombination aus den zwei bewährten Oximen Obidoxim und HI-6, welche gegenüber verschiedenen Organophosphaten abweichende Wirksamkeit aufweisen, stellt daher einen vielversprechenden Lösungsansatz dar (Worek und Thiermann

2013). Tabelle 16 zeigt, dass Obidoxim HI-6 bei der Reaktivierung, Sarin-, VX- sowie Paraoxon-gehemmter Acetylcholinesterase überlegen ist. HI-6 ist dagegen effektiver in der Reaktivierung Cyclosarin- und VR-gehemmter Acetylcholinesterase. Beide reaktivieren Soman- und Tabun-gehemmte Acetylcholinesterase kaum bzw. nicht (Thiermann et al. 2013).

Tabelle 16

Bimolekulare Reaktivierungskonstante 2. Ordnung k_r^2 ($\text{mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$)

	Obidoxim	HI-6
Sarin	29.9	13.5
Cyclosarin	0.4	27.1
Tabun	0.4	-
Soman	-	-
VX	32.6	21.0
VR	5.9	77.2
Paraoxon	25.2	0.7

Tabelle abgeändert nach Thiermann et al. 2013

Eine Erprobung von neuen Oximen oder Oximkombinationen gegenüber Organophosphat-Vergiftungen am Menschen ist ethisch nicht vertretbar. Aus diesem Grund muss zur Beurteilung der Wirksamkeit einer Oximtherapie auf Tierversuche oder in-vitro-Experimente zurückgegriffen werden.

Die Acetylcholinesterase stellt das wohl geeignete Instrument für kinetische Untersuchungen zu Wechselwirkungen von Organophosphaten und Oximen dar, da ihre Blockade der Hauptangriffspunkt für Organophosphate ist. Für diese Studie wurde die Acetylcholinesterase menschlicher Erythrozyten Membranen verwendet (Wills und DuBois 1972). Erythrozytäre Acetylcholinesterase kann als adäquater Ersatz für synaptische Acetylcholinesterase angesehen werden (Eckert et al. 2008), da das Enzym – unabhängig vom Ort seines Vorkommens – von nur einem Gen kodiert wird (Legacy 2000).

Aktuelle Autoinjektoren mit Obidoxim (250 mg) und HI-6 (500 mg) führen im Menschen nach intramuskulärer Verabreichung zu einer Plasmaspitzenkonzentration im Bereich von 30–40 μM , weshalb in dieser Studie ähnliche Dosen verwendet wurden (Sidell und Groff 1970; Clement et al. 1995). Die verwendeten, festen Konzentrationen sind zwar für

den Einsatz am Patienten am aussagekräftigsten, ermöglichen jedoch für die Kombinationstherapie aus Obidixom und HI-6 – neben der Berechnung der scheinbaren Konstante K_{obs} – nicht die Ermittlung übergeordneter Konstanten. Versuche mit weiteren unterschiedlichen Oximkonzentrationen der Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 wären zukünftig denkbar.

Das verwendete Versuchs-Setup sowie auch zahlreiche vergangene Studien (Worek et al 2004; Worek et al. 2012b) spiegeln die in-vivo-Situation oftmals nur unzureichend wider, da freies Organophosphat z. B. durch Dialyse entfernt wird. Bisherige Studien haben gezeigt, dass die Nettoreaktivierung insbesondere bei Insektizid-Vergiftung für hohe Pestizid-Dosen deutlich reduziert ist (Eyer et al. 2003b; Willems et al. 1993). Es wird angenommen, dass während terroristischer Attacken oder militärischer Einsätze mit Nervenkampfstoffen Dosen erreicht werden, die in etwa dem 5-fachen der LD₅₀ entsprechen. Dagegen können während Suizidversuchen durch Insektizide Dosen auftreten, die in etwa dem 100-fachen der LD₅₀ gleichkommen (Thiermann et. 2013). Weiterhin erlaubt das verwendete Setup lediglich die Verwendung definierter OP- und Oximkonzentrationen. Es ist daher sinnvoll, die Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 für die Reaktivierung Insektizid gehemmter menschlicher Acetylcholinesterase auch in einem dynamischen in-vitro-Modell zu testen, um die in-vivo-Situation realitätsnäher abzubilden, indem der Einfluss des freien Inhibitors sowie unterschiedliche OP und Oximkonzentrationen berücksichtigt werden (Eckert et al. 2006). Die vorhandenen Daten aus Tierversuchen zu Kombinationstherapien sind spärlich (Clement et al 1987; Maksimovic und Kovacevic 1987; Maksimovic et al. 1989; Kassa et al. 2010, 2011; Kassa et Kunesova 2010; Caisberger et al. 2018), weswegen weitere Studien notwendig sind, um mögliche Nebeneffekte sowie die effektive Dosis einer solchen Oximkombinationstherapie festzustellen (Worek et al. 2016).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Suizide mit Organophosphat-Insektiziden verursachen jedes Jahr weltweit über hunderttausend Todesfälle. Weiterhin besteht die Gefahr, dass derartige Substanzen im Rahmen terroristischer Angriffe eingesetzt werden. Die Einordnung solcher Stoffe in unterschiedliche Gefahrenstufen sowie Verbote haben geholfen, die Zahl der Todesfälle deutlich zu reduzieren.

Organophosphate hemmen das Enzym Acetylcholinesterase durch Phosphorylierung des Serinrestes im aktiven Zentrum irreversibel. Die Hemmung der Acetylcholinesterase führt zur Anreicherung des Neurotransmitters Acetylcholin im synaptischen Spalt, gefolgt von Überstimulation der Cholinrezeptoren des zentralen und peripheren Nervensystems sowie der motorischen Endplatte. Je nach Schwere der Vergiftung reichen die Symptome von vermehrtem Speichelfluss, über Atemstillstand bis hin zum Tod.

Als erfolgreiche Therapie hat sich die Gabe von Atropin bereits seit Jahrzehnten etabliert. Atropin wirkt als Antagonist am muskarinischen Rezeptor – bei allem Erfolg – jedoch lediglich symptomatisch. Den einzigen erfolgsversprechenden kausalen Therapieansatz bei Organophosphat-Vergiftungen stellt die Verabreichung von Oximen dar. Oxime können durch eine Übertragung des Phosphylrestes auf sich selbst die Enzymfunktion wiederherstellen. Für eine notfallmäßige Anwendung wurden Autoinjektoren zur intramuskulären Verabreichung entwickelt, die sowohl Atropin als auch ein Oxim enthalten. Keines der vorhandenen Oxime hat sich – trotz immensen Forschungsaufwandes in den letzten Jahrzehnten – als wirksam gegenüber einer großen Bandbreite von Organophosphaten erwiesen. Zu zwei der bewährtesten Oximen zählen Obidoxim und HI-6. Obidoxim ist z. B. ein guter Reaktivator Paraoxon-gehemmter Acetylcholinesterase, HI-6 dagegen reaktiviert Cyclosarin-gehemmte Acetylcholinesterase effektiv. Einen vielversprechenden Ansatz stellt somit eine Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 dar. Zurückliegende in-vitro-Studien haben gezeigt, dass eine Kombinationsgabe das Spektrum behandelbarer Organophosphat-Verbindungen erweitern kann. In Tierversuchen konnten teilweise sogar additive Effekte erzielt werden.

Ziel der vorliegenden Studie war es festzustellen, ob eine Kombinationstherapie im Vergleich zur Einzeltherapie einen positiven oder negativen Effekt bei Verwendung strukturell unterschiedlicher Organophosphat-Insektizide hat. Als geeigneter Parameter für die in-vitro-

Beurteilung der Wirksamkeit einer Oximtherapie gilt erythrozytäre Acetylcholinesterase. Die Kombinationstherapie aus Obidoxim und HI-6 hatte gegenüber der Einzeltherapie für keines der verwendeten Insektizid-Organophosphate negative Auswirkungen in Bezug auf die Nettoreaktivierung gehemmter Acetylcholinesterase. Anhand der vorliegenden Ergebnisse gibt es keinerlei Hinweise auf einen Nachteil der Kombinationstherapie gegenüber einer Obidoximeinzeltherapie. Diese Studie liefert daher wichtige Hinweise darauf, dass die Kombinationstherapie in Autoinjektoren bei Pestizidvergiftungen ohne negative Effekte verwendet werden könnte.

Weitere Tierstudien sind erforderlich, um mögliche Nebenwirkungen einer Kombinationstherapie zu erkennen und Hinweise auf mögliche effektive Oxim-Dosen zu erhalten.

ABSTRACT

Suicides with organophosphate pesticides are responsible for estimated hundred thousand of deaths each year worldwide. Furthermore, there is the possibility that these compounds could be misused carrying out terrorist attacks. Bans and the WHO Classification of organophosphates by hazard have led to a remarkable reduction of fatal casualties.

Organophosphates inhibit the enzyme acetylcholinesterase by phosphorylation of the serine residue in the active site irreversibly. Inhibition of acetylcholinesterase results in an accumulation of the neurotransmitter acetylcholine in the synaptic cleft, followed by an overstimulation of cholinoreceptors in the peripheral and central nervous system and in neuromuscular junctions. Depending on the severity of intoxication symptoms range from augmented ptalism to respiratory arrest and death.

The administration of atropine has been established as a successful therapy for decades. Despite all its success atropine as an antagonist of the muscarinic receptor acts merely symptomatic. Oximes are the only promising causal therapeutic approach to organophosphate poisoning so far. They can restore the enzyme function by removing the phosphyl-moiety. Autoinjectors for intramuscular administration that include both atropine and an oxime have been developed for emergency use. None of the existing oximes has proven to be effective against a wide range of organophosphates, despite immense research efforts in recent decades. Two of the most accepted oximes are obidoxime and HI-6.

Obidoxime for example is a good reactivator of paraoxon-inhibited acetylcholinesterase, whereas HI-6 effectively reactivates cyclosarin-inhibited acetylcholinesterase. Thus, a combination of obidoxime and HI-6 seems to be a promising approach. Previous in vitro studies have shown that the combination can extend the spectrum of treatable organophosphate compounds and in animal trials partly even additive effects could be achieved.

The aim of this study was to determine whether a combination therapy, compared to the individual therapy, has a positive or negative effect when using structurally different organophosphate pesticides. Erthrocyte acetylcholinesterase is presumed to be a suitable parameter for in vitro evaluation of the efficacy of oxime therapy. One major finding is, that a combination therapy of obidoxime and HI-6, compared to an individual therapy for any of the pesticide organophosphates used, had no negative effects on the net reactivation of inhibited acetylcholinesterase. The results of this study found no evidence that a combination therapy carries any disadvantage compared to a therapy of obidoxime only. Thus, this study indicates that a combination therapy using autoinjectors could be applied to treat pesticide intoxications without any negative effects.

Further animal studies are necessary to detect potential side effects of a combined therapy and to gain insights about effective oxime dosages.

6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1.** Strukturformel von TEPP
- Abb. 2.** Strukturformeln der G-Stoffe Tabun, Sarin und Gabun
- Abb. 3.** Schradersche Acylformel
- Abb. 4.** Strukturformeln der V-Stoffe VG, VX und VR
- Abb. 5.** Strukturformeln verschiedener Insektizide
- Abb. 6.** Hemmung der Acetylcholinesterase durch Organophosphate und mögliche Folgereaktionen
- Abb. 7.** Wirkung von Organophosphaten an synaptischen Enden
- Abb. 8.** Strukturformeln von Obidoxim, HI-6 und Pralidoxim
- Abb. 9.** Beispiele für die Umwandlung von Phosphorthioaten in ihre Oxon-Metaboliten durch Cytochrom P450
- Abb. 10.** Strukturformeln verwendeter Organophosphat-Insektizide
- Abb. 11.** Ellmann-Reaktion
- Abb. 12.** Prinzip der Bestimmung der Cholinesteraseaktivität
- Abb. 13.** Reaktivierung Organophosphat-gehemmter Acetylcholinesterase nach Aldridge und Reiner
- Abb. 14.** Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-ethyl-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün)
- Abb. 15.** Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-ethy- gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün)
- Abb. 16.** Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-ethyl-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (10 µM; rot), HI-6 (40 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (10 µM + 40 µM; grün)
- Abb. 17.** Zeitabhängige Reaktivierung Chlorpyrifos-oxon-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün)

- Abb. 18.** Zeitabhängige Reaktivierung Chlorpyrifos-oxon-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün)
- Abb. 19.** Zeitabhängige Reaktivierung Chlorpyrifos-oxon-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (10 µM; rot), HI-6 (40 µM; blau) oder Obidoxim + H-I6 (10 µM + 40 µM; grün)
- Abb. 20.** Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-methyl-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je 30 µM; grün)
- Abb. 21.** Zeitabhängige Spontanreaktivierung Paraoxon-methyl-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase
- Abb. 22.** Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-methyl-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je 30 µM; grün)
- Abb. 23.** Zeitabhängige Spontanreaktivierung Paraoxon-methyl-gehemmter, verdünnter humaner Acetylcholinesterase
- Abb. 24.** Zeitabhängige Reaktivierung Omethoat-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je 30 µM; grün)
- Abb. 25.** Zeitabhängige Reaktivierung Omethoat-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je 30 µM; grün)
- Abb. 26.** Zeitabhängige Reaktivierung PMO-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je 30 µM; grün)
- Abb. 27.** Zeitabhängige Reaktivierung PMO-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (je 30 µM; grün)
- Abb. 28.** Zeitabhängige Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün)

- Abb. 29.** Zeitabhängige Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter, 100-fach verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün)
- Abb. 30.** Zeitabhängige Reaktivierung Fenamiphos-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (10 µM; rot), HI-6 (40 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (10 µM + 40 µM; grün)
- Abb. 31.** Zeitabhängige Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün)
- Abb. 32.** Zeitabhängige Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter, verdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün)
- Abb. 33.** Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-ethyl-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün) – Lineare Regression
- Abb. 34.** Zeitabhängige Reaktivierung Paraoxon-ethyl-gehemmter, unverdünnter humaner Acetylcholinesterase mit Obidoxim (30 µM; rot), HI-6 (30 µM; blau) oder Obidoxim + HI-6 (30 µM + 30 µM; grün) – Nicht-lineare Regression
- Abb. 35 a+b.** Zeit- und konzentrationsabhängige Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter menschlicher Acetylcholinesterase durch Obidoxim (a) und HI-6 (b). Nicht-lineare Regression
- Abb. 36 a+b.** Zeit- und konzentrationsabhängige Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter menschlicher Acetylcholinesterase durch Obidoxim (a) und HI-6 (b). Lineare Regression
- Abb. 37.** Michaelis-Menten-Kinetik für Ethoprophos

7. TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 1** WHO-Schema zur Klassifizierung von Pestiziden nach Gefahr
- Tabelle 2** Symptome der akuten Vergiftung mit Organophosphaten
- Tabelle 3** Einteilung der verwendeten Insektizide in Subklassen
- Tabelle 4** Strukturmerkmale eingesetzter Pestizide und deren Einstufung in die WHO Klassifikation nach Gefahr
- Tabelle 5** Messansatz für die Bestimmung unverdünnter Acetylcholinesteraseaktivität
- Tabelle 6** Messansatz für die Bestimmung verdünnter Acetylcholinesteraseaktivität
- Tabelle 7** Hemmung der Acetylcholinesterase durch verschiedene Pestizide vor und nach Dialyse
- Tabelle 8** Ansätze für die Reaktivierung gehemmter, unverdünnter Acetylcholinesterase
- Tabelle 9** Ansätze für die Reaktivierung gehemmter, verdünnter Acetylcholinesterase
- Tabelle 10** Messansätze für die Bestimmung der Oxim-Hemmung
- Tabelle 11** k_{obs} -Werte für Obidoxim (30 μM), HI-6 (30 μM) und die Kombination aus Obidoxim und HI-6 (je 30 μM) für die Reaktivierung unverdünnter und verdünnter OP-gehemmter-Acetylcholinesterase
- Tabelle 12** k_{obs} -Werte für Obidoxim (10 μM), HI-6 (40 μM) und die Kombination aus Obidoxim und HI-6 (10 μM + 40 μM) bei unverdünnter PXE-, und Fenamiphos-gehemmter Acetylcholinesterase
- Tabelle 13** Reaktivierungskonstanten für Oxim-induzierte Reaktivierung Ethoprophos-gehemmter menschlicher Acetylcholinesterase mit nicht-linearer und linearer Regressionsanalyse
- Tabelle 14** Hemmung humaner, unverdünnter Acetylcholinesterase mit Obidoxim, HI-6, und der Kombination aus Obidoxim und HI-6 in verwendeten Oximkonzentrationen
- Tabelle 15** Reaktivierungskonstanten für Oxim-induzierte Reaktivierung OP-gehemmter menschlicher Acetylcholinesterase
- Tabelle 16** Bimolekulare Reaktivierungskonstante 2. Ordnung kr_2 ($\text{mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$)

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AChE	Acetylcholinesterase
Acetyl Co-A	acetyliertes Coenzym A
ACN	Acetonitril
ASCh	Acetylthiocholiniodid
CWÜ	Chemiewaffenübereinkommen
CPO	Chlorpyrifos-oxon
Cyp P450	Cytochrom P450
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoësäure
E600	Paraoxon
E605	Parathion
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
GA	Tabun
GB	Sarin
GD	Soman
Ghosts	Isolierte, Hämoglobin-freie Erythrozytenmembranen
HCL	Salzsäure
HI-6	4-(Aminocarbonyl)-1-[({2-[{(E)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium-1-YL}methoxy)methyl]pyridinium
H-Oxime	Hagedorn-Oxime
K203	[(E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide]
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
M	Molare Masse
OP	Organophosphat
OPCW	Organisation für das Verbot chemischer Waffen
PMO	Pirimiphos-methyl-oxon
POX	Phosphyloxim
PXE	Paraoxon-ethyl
PXM	Paraoxon-methyl

$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TEPP	Tetraethylpyrophosphat
TNB ⁻	5-Thio-2-nitrobenzoat
VG	2-diethoxyphosphorylsulfanyl-N,N-diethylethanamine (= Amiton)
VR	N,N-diethyl-2-(methyl-(2-methylpropoxy)phosphoryl)sulfanylethanamine (= "Russian VX")
VX	O-Ethyl-S-2-diisopropylaminoethylmethylphosphonothiolat
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

9. LITERATURVERZEICHNIS

Aldridge WN, Reiner E (1972)

Enzyme inhibitors as substrates. Interactions of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London.

Arbusow AE (1906)

Über die Struktur der phosphorigen Säure und ihre Derivate. IV. Isomerisation und Übergang der Verbindungen des dreiwertigen Phosphors in solche des fünfwertigen. *Chem Zbl.* 2: 1640.

Ashani Y, Bhattacharjee AK, Leader H, Saxena A, Doctor BP (2003)

Inhibition of cholinesterases with cationic phosphoryl oximes highlights distinctive properties of the charged pyridine group of quaternary oxime reactivators. *Biochem Pharmacol.* 66(2): 191-202.

Bajgar J (2004)

Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv Clin Chem.* 38: 151-216.

Ballantyne B, Marrs TC (1992)

Overview of the biological and clinical aspects of organophosphates and carbamates. In: Ballantyne B, Marrs T (eds) *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates.* Butterworth & Heinemann, Oxford, pp. 3–14.

Bertolote JM, Fleischmann A, Eddleston M, Gunnell D (2006)

Deaths from pesticide poisoning: a global response. *Br J Psychiatr.* 189: 201–203.

Caisberger F, Pejchal J, Misik J, Kassa J, Valis M, Kuca K (2018)

The benefit of combinations of oximes for the ability of antidotal treatment to counteract sarin-induced brain damage in rats. *BMC Pharmacol Toxicol.* 19(1): 35.

Casida JE, Durkin KA (2013)

Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chem Biol Interact.* 203(1): 221–225.

Chai PR, Boyer EW, Al-Nahhas H, Erickson TB (2017)

Toxic chemical weapons of assassination and warfare: nerve agents VX and sarin. *Toxicol Commun.* 1(1): 21–23.

Chowdhury FR, Dewan G, Verma VR, Knipe DW, Isha IT, Faiz MA, Gunnell DJ, Eddleston M (2018)

Bans of WHO Class I Pesticides in Bangladesh—suicide prevention without hampering agricultural output. *Int J Epidemiol.* 247(1): 175–184.

Clement JG, Bailey DG, Madill HD, Tran LT, Spence JD (1995)

The acetylcholinesterase oxime reactivator HI-6 in man: pharmacokinetics and tolerability in combination with atropine. *Biopharm. Drug Dispos.* 16(5): 415–425.

Clement JG, Shiloff JD, Gennings C (1987)

Efficacy of a combination of acetylcholinesterase reactivators, HI-6 and obidoxime, against tabun and soman poisoning of mice. *Arch Toxicol.* 61(1): 70-75.

de Clermont (1854)

Chimie organique- note sur la preparation de quelques ethers. *Compt rend Acad Sci (Paris).* 39: 338-341.

de Jong LPA, Wolring GZ (1978)

Effect of 1-(ar)-alkyl-hydroxyimino-methyl-pyridinium salts on reactivation and aging of acetylcholinesterase inhibited ethyldimethylphosphoramidocyanide (tabun). *Biochem Pharmacol.* 27(18): 2229-2235.

Dittmeyer R, Keim W, Kreysa G, Oberholz A (2005)

Winnacker, Küchler: Chemische Technik, Ernährung, Gesundheit, Konsumgüter, Band 8, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 216 ff.

Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL (2010)
Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact.* 187(1-3): 10-22.

Eckert S, Eyer P, Herkert N, Bumm R, Weber G, Thiermann H, Worek F (2008)
Comparison of the oxime-induced reactivation of erythrocyte and muscle acetylcholinesterase following inhibition by sarin or paraoxon, using a perfusion model for the real-time determination of membrane-bound acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 75(3): 698-703.

Eckert S, Eyer P, Mückter H, Worek F (2006)
Development of a dynamic model for real-time determination of membrane-bound acetylcholinesterase activity upon perfusion with inhibitors and reactivators. *Biochem Pharmacol.* 72(3): 358-365.

Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH (2008)
Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* 371: 597–607.

Ellison DH (2008)
Handbook of chemical and biological warfare agents. CRC press, Boca Raton.

Ellmann GL (1958)
A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 74(2): 443-450.

Ellman GL, Courtney KD, Anders V, Featherstone RM (1961)
A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7(2): 88-95.

Erdmann WD (1968)
Antidotbehandlung bei Alkylphosphatvergiftungen. *Arch Toxikol.* 24(1): 30–40.

Erdmann WD, von Clarmann M (1963)

Ein neuer Esterase-Reaktivator für die Behandlung von Vergiftungen mit Alkylphosphaten

Dtsch. Med. Wochenschr. 88(45): 2201-2206.

Eyer F, Meischner V, Kiderlen D, Thiermann H, Worek F, Haberkorn M, Felgenhauer N, Zilker T, Eyer P (2003b)

Human parathion poisoning: a toxicokinetic analysis. *Toxicol Rev.* 22(3): 143-163.

Eyer P, Worek F (2007)

Oximes. In: Marrs TC, Maynard RL, Sidell, FR (eds), *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 305–329.

Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E (2003a)

Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochem.* 312(2): 224-227.

Foxenberg RJ, McGarrigle BP, Knaak JB, Kostyniak PJ, Olson JR (2007)

Human hepatic cytochrome p450-specific metabolism of parathion and chlorpyrifos. *Drug Metab Dispos.* 35(2): 189-193.

Franciskovic L, Skrinjaric-Spoljar M, Reiner E (1993)

Interaction of imidazolium and pyridinium dioximes with human erythrocyte acetylcholinesterase. *Chem. Bio. Interact.* 87(1-3): 323.

Goldsmith M, Ashani Y (2018)

Catalytic bioscavengers as countermeasures against organophosphate nerve agent. *Chemico-Biological Interactions* 292: 50-64.

Gorecki L, Soukup O, Kucera T, Malinak D, Jun D, Kuca K, Musilek K, Korabecny J (2019)

Oxime K203: a drug candidate for the treatment of tabun intoxication. *Arch Toxicol.* 93(3): 673-691.

Hasall, KA (1990)

The biochemistry and uses of pesticides. VCH-Verlag, Weinheim.

Hayes WJ, Laws ER (1991)

Classes of Pesticides. In: *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego.

Kalisiak J, Ralph EC, Zhang J, Cashman JR (2011)

Amidine-oximes: reactivators for organophosphate exposure. *J Med Chem.* 54(9): 3319-3330.

Kassa J, Karasova JZ, Pavlikova R, Misik J, Caisberger F, Bajgar J (2010)

The influence of combinations of oximes on the reactivating and therapeutic efficacy of antidotal treatment of tabun poisoning in rats and mice. *J Appl Toxicol.* 30(2): 120-124.

Kassa J, Karasova JZ, Pavlikova R, Musilek K, Kuca K, Bajgar J, Jung YS (2011)

A comparison of reactivating and therapeutic efficacy of bispyridinium acetylcholinesterase reactivator KR-22934 with the oxime K203 and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice. *Toxicol Mech Methods* 21(3): 241-245.

Kassa J, Kunesova G (2012)

The benefit of combination of oximes for the neuroprotective efficacy of antidotal treatment of sarin-poisoned rats. *Toxicol Mech Methods* 22(4): 260-267.

Kiderlen D, Eyer P, Worek F (2005)

Formation and disposition of diethylphosphoryl-obidoxime, a potent anticholinesterase that is hydrolyzed by human paraoxonase (PON1). *Biochem Pharmacol.* 69(12): 1853–1867.

Kim J, Malpani Y, Lee J, Shin J, Han S, Jung Y (2018)

Novel tacrine-pyridinium hybrid reactivators of organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase: Synthesis, molecular docking, and in vitro reactivation study.

Bioorg Med Chem Lett. 28(23-24): 3784-3786.

Kitz RJ, Ginsburg S, Wilson IB (1965)

Activity-structure relationships in the reactivation of diethylphosphoryl acetylcholinesterase by phenyl-1-methyl pyridinium ketoximes. *Biochem Pharmacol.* 14(10): 1471-1477.

Knipe DW, Chang SS, Dawson A, Eddleston M, Konradsen F, Metcalfe C, Gunnell D (2017)

Suicide prevention through means restriction: Impact of the 2008-2011 pesticide restrictions on suicide in Sri Lanka. *PLoS One* 12(3): e0172893.

Kuca K, Jun D Junova L, Musilek K, Hrabinova M, da Silva JAV, Ramalho TC, Valko M, Wu Q, Nepovimova E, França TCC (2018)

Synthesis, Biological Evaluation, and Docking Studies of Novel Bisquaternary Aldoxime Reactivators on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Paraoxon. *Molecules.* 23(5): 1103.

Kunze UR, Schwedt G (2009)

Grundlagen der quantitativen Analyse. Wiley-VCH, Weinheim, p. 274.

Legacy C (2000)

Why so many forms of acetylcholinesterase? *Microsc. Res. Tech.* 49(1): 56.

Lotti M (2001)

Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In: Krieger RI (ed) *Handbook of pesticide toxicology.* Academic Press, San Diego, pp. 1043–1085.

Luther M (1876)

Die Bibel. Bibelgesellschaft, Köln.

Luo C, Saxena A, Smith M, Garcia G, Radic Z, Taylor P, Doctor BP (1999)

Phosphoryl oxime inhibition of acetylcholinesterase during oxime reactivation is prevented by edrophonium. *Biochemistry* 38(31): 9937–9947.

Macilwain C (1993)

Study proves Iraq used nerve gas. *Nature* 363: 3.

Maksimovic M, Kovacevic V, Binenfeld Z (1989)

Protective and reactivating effects of HI-6-toxogonin mixture in rats and guinea-pigs poisoned by nerve agents. *Acta Pharm Jugosl.* 39: 27-33.

Maksimovic M, Pantelic D, Kovacevic V (1987)

Protective effects of HI-6 and toxogonin in soman-and tabun-poisoned rats. *Acta Pharm Jugosl.* 37: 227-229.

Michaelis CAA (1903)

Über die organischen Verbindungen des Phosphors mit Stickstoff. *Liebigs Ann. Chem.* 326: 129-258.

Mohamed-Ali H (1992)

Spätschäden der Giftgaswirkung bei den Überlebenden des irakischen Giftgaskrieges gegen das kurdische Volk. *Wiener Med Wschr.* 142(1): 8-15.

Moshiri M, Darchini-Maragheh E, Balali-Mood M (2012)

Advances in toxicology and medical treatment of chemical warfare nerve agents. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 20(1): 81.

Namba T, Hiraki K (1958)

PAM (pyridine-2-aldoxime methiodide) therapy for alkyl-phosphate poisoning. *J Am Med Assoc.* 166(15): 1834-1839.

Newmark J (2004)

Therapy for nerve agent poisoning. *Arch. Neurol.* 61(5): 649-652.

Otto M (2011)

Analytische Chemie. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 236–237.

Peter JV, Moran JL, Graham PL (2007)

Advances in the management of organophosphate poisoning. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 8(10): 1451-1464.

Peter JV, Sudarsan TI, Moran JL (2014)

Clinical features of organophosphate poisoning: A review of different classification systems and approaches. *Ind J Crit Care Med.* 18: 735–745.

Petroianu GA (2015)

History of Organophosphorus Cholinesterase Inhibitors & Reactivators. *Military Medical Science Letters* 84(4): 182–185.

Perkampus HH (1986)

UV-VIS-Spektroskopie und ihre Anwendungen. Springer-Verlag, Berlin.

Pita R, Domingo J (2014)

The use of chemical weapons in the Syrian conflict. *Toxics* 2(3): 391–402.

Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B (1983)

Reassessment of Ellman's reagent. *Methods in enzymology* 91: 49–60.

Robinson JP (1971)

The rise of CB weapons. In: Almquist and Wiksell (eds) *The Problem of Chemical and Biological Warfare*. SIPRI, Stockholm, Vol. 1.

Schindler D, Toman J (1988)

The Laws of Armed Conflicts: A Collection of Conventions, Resolutions, and Other Documents. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Schmaltz F (2005)

Kampfstoff-Forschung im Nationalsozialismus: Zur Kooperation von Kaiser-Wilhelm-Instituten, Militär und Industrie. Wallstein Verlag, Göttingen.

Schrader G (1951)

Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphor-Verbindungen. *Monogr. Angew. Chem.* 62: 1-62.

Sidell FR, Groff WA (1970)

Toxogonin: blood levels and side effects after intramuscular administration in man. *J. Pharm. Sci.* 59(6): 793–797.

Sidell FR, Newmark J, McDonough JH (2008)

Nerve Agents. In: Lenhart MK, Tuorinsky SD (eds) *Medical aspects of chemical warfare*. Department of the Army, Washington,D.C., pp. 155-219.

Simon C (1999)

DDT: Kulturgeschichte einer chemischen Verbindung. Christoph Merian Verlag, Basel.

Stenzel J, Worek F, Eyer P (2007)

Preparation and characterization of dialkylphosphoryl-obidoxime conjugates, potent anticholinesterase derivatives that are quickly hydrolyzed by human paraoxonase (PON_{1^{192Q}}). *Biochem Pharmacol.* 74(9): 1390–1400.

Szinicz L (2005)

History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* 214(3): 167–181.

Thiermann H, Steinritz D, Worek F, Radtke M, Eyer P, Eyer F, Felgenhauer N, Zilker T (2011)

Atropine maintenance dosage in patients with severe organophosphate pesticide poisoning. *Toxicol Lett.* 206(1): 77–83.

Thiermann H, Szinicz L, Eyer P, Zilker T, Worek F (2005)

Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chem Biol Interact.* 157-158: 345-347

Thiermann H, Worek F, Kehe K (2013)

Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. *Chem Biol Interact.* 206(3): 435-443.

Wang EIC, Braid PE (1967)

Oxime reactivation of diethylphosphoryl human serum cholinesterase. *J Biol Chem.* 242(11): 2683-2687.

Willems JL, De Bisschop HC, Verstraete AG, Declerck C, Christiaens Y, Vanscheeuwyck P, Buylaert WA, Vogelaers D, Colardyn F (1993)

Cholinesterase reactivation in organophosphorus poisoned patients depends on the plasma concentrations of the oxime pralidoxime methylsulphate and of the organophosphate. *Arch. Toxicol.* 67(2): 97-84.

Wills JH, DuBois KP (1972)

The measurement and significance of changes in the cholinesterase activities of erythrocytes and plasma in man and animals. *Crit. Rev. Toxicol.* 1(2): 153.

Worek F, Aurbek N, Koller M, Becker C, Eyer P, Thiermann H (2007b)

Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramides. *Biochem Pharmacol.* 73(11): 1807-1817.

Worek F, Aurbek N, Thiermann H (2007a)

Reactivation of organophosphate-inhibited human AChE by combinations of obidoxime and HI 6 in vitro. *J. Appl. Toxicol.* 27(6): 582-588.

Worek F, Diepold C, Eyer P (1999a)

Dimethylphosphoryl-inhibited human cholinesterases: inhibition, reactivation, and aging kinetics. *Arch. Toxicol.* 73: 7-14.

- Worek F, Eyer P, Kiderlen D, Thiermann H, Szinicz L (2000)
Effect of human plasma on the reactivation of sarin-inhibited human erythrocyte acetylcholinesterase. *Arch Toxicol.* 74(1), 21–26.
- Worek F, Eyer P, Aurbek N, Szinicz L, Thiermann (2007c)
Recent advances in evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning by in vitro analysis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 219(2-3): 226-234.
- Worek F, Eyer P, Thiermann H (2012a)
Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Test. Anal.* 4(3-4): 282–291.
- Worek F, Koller M, Thiermann H, Wille T (2016b)
Reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase by obidoxime, HI-6 and obidoxime+HI-6: Kinetic in vitro study with simulated nerve agent toxicokinetics and oxime pharmacokinetics. *Toxicology* 350-352: 25-30.
- Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P (1999b)
Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta.* 288(1-2): 73-90.
- Worek F, Reiter G, Eyer P, Szinicz L (2002)
Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Arch Toxicol.* 76(9): 523–529.
- Worek F, Thiermann H (2013)
The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacol Ther.* 139(2): 249-259.

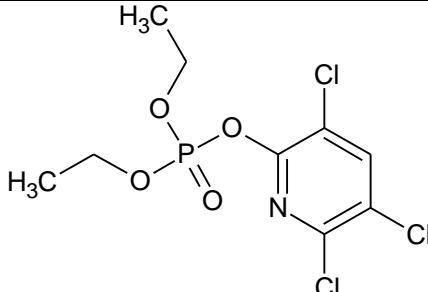
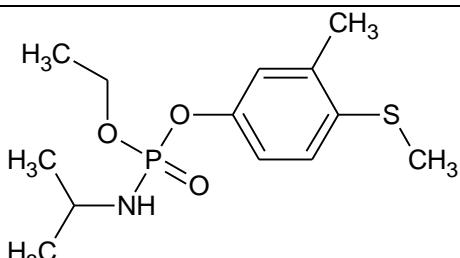
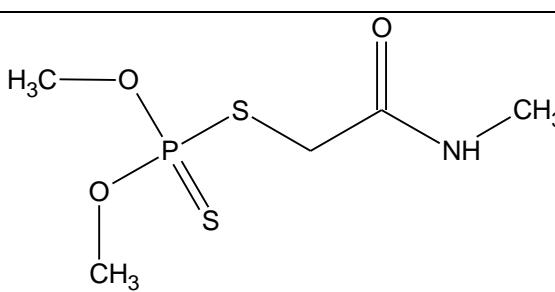
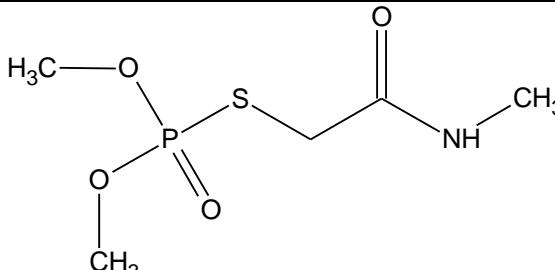
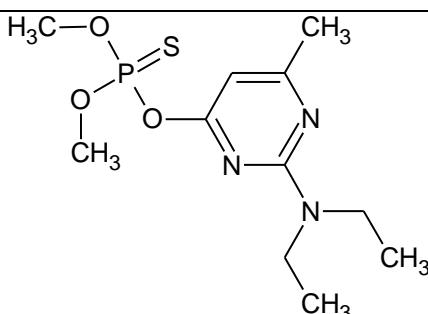
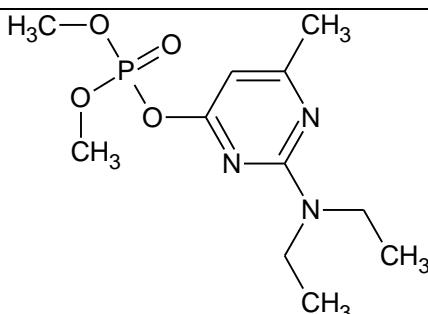
- Worek F, Thiermann H, Szinicz L, Eyer P (2004)
Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochemical Pharmacology* 68(11): 2237-2248.
- Worek F, Wille T, Aurbek N, Eyer P, Thiermann H (2010)
Reactivation of organophosphate-inhibited human, Cynomolgus monkey, swine and guinea pig acetylcholinesterase by MMB-4: a modified kinetic approach. *Toxicol Appl Pharmacol.* 249(3): 231-237.
- Worek F, Wille T, Koller M, Thiermann H (2012b)
Reactivation kinetics of a series of related bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase--Structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* 83(12): 1700-1706.
- Worek F, Wille T, Koller M, Thiermann H (2016a)
Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat. *Arch Toxicol.* 90(9): 2131–2145.
- World Health Organization (2010)
The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard (abgerufen am 1.10.2018).
https://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf?ua=1.
- Yanagisawa N, Morita H, Nakajima T (2006)
Sarin experiences in Japan: Acute toxicity and long-term effects. *Journal of the Neurological Sciences* 249(1): 76-85.
- Zech R (1969)
Über die Hemmung der Acetylcholin-Esterase und Cholin-Esterase durch Pyridiniumoxime. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350(2): 1415.

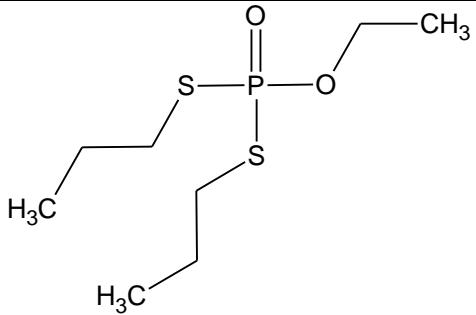
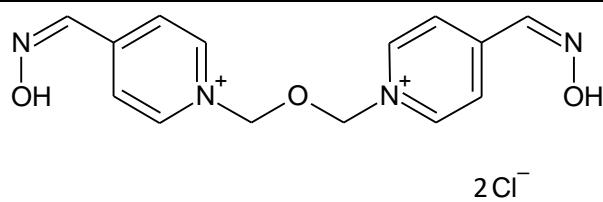
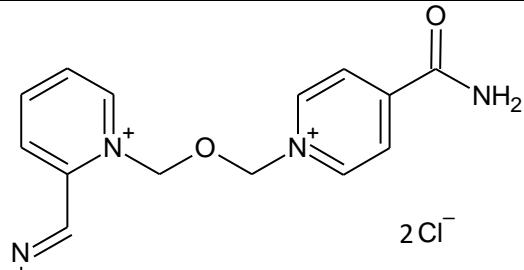
Zeidler O (1874)

Verbindungen von Chloral mit Brom- und Chlorbenzol. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 7(2): 1180–1181.

10. ANHANG**A) Stoffe**

Substanz	Strukturformel	Molekulargewicht in g/mol	CAS-No.
Parathion (E605)		291.258	56-38-2
Paraoxon-ethyl		275.197	311-45-5
Paraoxon-methyl		247.143	950-35-6
Chlorpyrifos		350.575	2921-88-2

Chlorpyrifos-oxon		334.514	5598-15-2
Fenamiphos		303.357	22224-92-6
Dimethoat		229.249	60-51-5
Omethoat		213.188	1113-02-6
Pirimiphos-methyl		305.333	29232-93-7
Pirimiphos-methyl-oxon		289.272	64709-45-1.

Ethoprophos		242.332	13194-48-4
Obidoxim		359.207	114-90-9
HI-6		359.21	34433-31-3

B) 2001/520/EG: Entscheidung der Kommission vom 9. Juli 2001 über die Nichtaufnahme von Parathion in Anhang I der Richtlinie 91/414/EWG des Rates

Entscheidung der Kommission

vom 9. Juli 2001

über die Nichtaufnahme von Parathion in Anhang I der Richtlinie 91/414/EWG des Rates und die Aufhebung der Zulassungen für Pflanzenschutzmittel mit diesem Wirkstoff

(Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2001) 1772)

(Text von Bedeutung für den EWR)

(2001/520/EG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN -

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 91/414/EWG des Rates vom 15. Juli 1991 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln(1), zuletzt geändert durch die Richtlinie 2001/36/EG der Kommission(2), insbesondere auf Artikel 8 Absatz 2 Unterabsatz 4,

gestützt auf die Verordnung (EWG) Nr. 3600/92 der Kommission vom 11. Dezember 1992 mit Durchführungsbestimmungen für die erste Stufe des Arbeitsprogramms gemäß Artikel 8 Absatz 2 der Richtlinie 91/414/EWG des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln(3), zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1972/1999(4), insbesondere auf Artikel 7 Absatz 3a Buchstabe b),

in Erwägung nachstehender Gründe:

(1) Gemäß Artikel 8 Absatz 2 der Richtlinie 91/414/EWG führt die Kommission ein Arbeitsprogramm für die Prüfung von Wirkstoffen in Pflanzenschutzmitteln durch, die vor dem 15. Juli 1993 bereits auf dem Markt waren. Mit der Verordnung (EWG) Nr. 3600/92 wurden die Durchführungsbestimmungen für dieses Programm festgelegt.

(2) Mit der Verordnung (EG) Nr. 933/94 der Kommission(5), zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 2230/95(6), wurden die Wirkstoffe festgelegt, die im Rahmen der Verordnung (EWG) Nr. 3600/92 zu prüfen sind, sowie die Bericht erstattenden Mitgliedstaaten für die einzelnen Wirkstoffe bestimmt und die Hersteller der einzelnen Wirkstoffe identifiziert, die rechtzeitig einen Antrag gemäß Artikel 4 Absatz 2 der Verordnung (EWG) Nr. 3600/92 eingereicht haben.

(3) Parathion ist einer der 90 in der Verordnung (EG) Nr. 933/94 aufgeführten Wirkstoffe.

(4) Gemäß Artikel 7 Absatz 1 Buchstabe c) der Verordnung (EWG) Nr. 3600/92 hat Italien als Bericht erstattender Mitgliedstaat der Kommission am 30. November 1998 einen Bericht über seine Bewertung der Informationen zugeleitet, die von den Antragstellern gemäß Artikel 6 Absatz 1 der genannten Verordnung übermittelt worden waren.

(5) Nach Erhalt des Berichts des Bericht erstattenden Mitgliedstaats hat die Kommission gemäß Artikel 7 Absatz 3 der Verordnung (EWG) Nr. 3600/92 Sachverständige der Mitgliedstaaten sowie den Hauptantragsteller (Cheminova) angehört.

(6) Der von Italien erstellte Bewertungsbericht wurde von den Mitgliedstaaten und der Kommission im Rahmen des Ständigen Ausschusses für Pflanzenschutz geprüft. Diese Prüfung wurde am 12. Dezember 2000 mit dem Beurteilungsbericht der Kommission für Parathion gemäß Artikel 7 Absatz 6 der Verordnung (EWG) Nr. 3600/92 abgeschlossen.

(7) Wie aus den Bewertungen der vorgelegten Informationen hervorging, wurde nicht nachgewiesen, dass Pflanzenschutzmittel mit Parathion unter den vorgeschlagenen Anwendungsbedingungen allgemein die Anforderungen gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstaben a) und b) der Richtlinie 91/414/EWG erfüllen, insbesondere im Hinblick auf die Sicherheit der Anwender, die Parathion potenziell ausgesetzt sind, sowie im Hinblick auf Verbleib und Verhalten des Wirkstoffs in der Umwelt und seine möglichen Auswirkungen auf Nichtzielorganismen.

(8) Der Hauptantragsteller hat der Kommission und dem Bericht erstattenden Mitgliedstaat mitgeteilt, dass er künftig nicht mehr an dem Arbeitsprogramm für diesen Wirkstoff teilnehmen will. Somit werden keine weiteren Informationen übermittelt.

(9) Dieser Wirkstoff kann daher nicht in Anhang I der Richtlinie 91/414/EWG aufgenommen werden.

(10) Wurde eine Frist gemäß Artikel 4 Absatz 6 der Richtlinie 91/414/EWG durch einen Mitgliedstaat für die Beseitigung, die Lagerung, den Absatz und die Verwendung bestehender Lagervorräte von parathionhaltigen Pflanzenschutzmitteln eingeräumt, so darf sie nicht länger als 12 Monate sein, um die Verwendung der Lagervorräte auf nur eine weitere Wachstumssaison zu begrenzen.

(11) Diese Entscheidung greift nicht etwaigen Maßnahmen vor, welche die Kommission in Bezug auf diesen Wirkstoff im Rahmen der Richtlinie 79/117/EWG des Rates(7) zu einem späteren Zeitpunkt treffen wird.

(12) Die in dieser Entscheidung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Ausschusses für Pflanzenschutz -

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Parathion wird nicht als Wirkstoff in Anhang I der Richtlinie 91/414/EWG aufgenommen.

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten stellen Folgendes sicher:

1. Alle Zulassungen für Pflanzenschutzmittel mit Parathion werden innerhalb von 6 Monaten ab dem Zeitpunkt des Erlasses dieser Entscheidung zurückgenommen.

2. Ab dem Zeitpunkt des Erlasses dieser Entscheidung werden Zulassungen im Rahmen der Ausnahmeregelung gemäß Artikel 8 Absatz 2 der Richtlinie 91/414/EWG für Pflanzenschutzmittel mit Parathion weder erteilt noch erneuert.

Artikel 3

Jede von den Mitgliedstaaten gemäß Artikel 4 Absatz 6 der Richtlinie 91/414/EWG eingeräumte Frist muss so kurz wie möglich sein und darf 18 Monate ab dem Zeitpunkt des Erlasses dieser Entscheidung nicht überschreiten.

Artikel 4

Diese Entscheidung ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 9. Juli 2001

Für die Kommission

David Byrne

Mitglied der Kommission

- (1) ABl. L 230 vom 19.8.1991, S. 1.
- (2) ABl. L 164 vom 20.6.2001, S. 1.
- (3) ABl. L 366 vom 15.12.1992, S. 10.
- (4) ABl. L 244 vom 16.9.1999, S. 41.
- (5) ABl. L 107 vom 28.4.1994, S. 8.
- (6) ABl. L 225 vom 22.9.1995, S. 1.
- (7) ABl. L 33 vom 8.2.1979, S. 36.

Quelle:

<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001D0520:DE:HTML>

(abgerufen am 01.10.2018)

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Adrian Loher, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Reaktivierung Insektizid-gehemmter humaner Acetylcholinesterase durch eine Kombination der Oxime Obidoxim und HI-6 – eine kinetische in-vitro-Studie“ 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, den 19.03.2020

Adrian Loher