

Evaluering av tre typer autoinjektor-regimer mot nervegassforgiftning

Pål Aas, Siri Enger og Trond Myhrer

Forsvarets forskningsinstitutt (FFI)

15. desember 2011

FFI-rapport 2011/02315

119401

P: ISBN 978-82-464-2030-1

E: ISBN 978-82-464-2031-8

Emneord

Nervegass

Oksimer

Antikolinergika

Antikonvulsiva

Nevroproteksjon

Autoinjektor

Medisinsk behandling

Godkjent av

Janet Martha Blatny

Prosjektleder

Bjørn Arne Johnsen

Forskningssjef

Jan Ivar Botnan

Avdelingssjef

Paul Narum

Adm direktør

Sammendrag

Forsvaret er utstyrt med akuttmedisinske motmidler som har til formål å redusere skader på mennesker og å øke overlevelse etter nervegasseksponering. Dette er legemidler som skal benyttes både profylaktisk og i oppfølgende medisinsk behandling etter eksponering. Profylaksen består av vernetabletter mot nervegass som skal øke sannsynlighet for overlevelse og sammen med bruk av autoinjektorer redusere skadeomfanget på personer etter nervegass-eksponering. Profylakse er spesielt viktig i beskyttelse mot nervegassen soman og ble innført i Forsvaret på grunn av denne nervegassen. Dette dreier seg om legemidler som administreres av soldatene selv eller av medsoldater. I Norge benyttes pyridostigmin bromid i profylakse og atropin, oksimet toksogonin (obidoksim) og diazepam (valium) i medisinsk behandling. Disse legemidlene eller tilsvarende benyttes også av de fleste andre NATO-land, men legemidlene er imidlertid ikke tilstrekkelig effektive i å hindre dødsfall eller utvikling av skader på kroppens organer. Nervesystemet (hjernen) er spesielt følsomt for virkninger av nervegass.

Denne rapporten presenterer resultater fra dyreeksperimentelle studier på albino rotter hvor effektiviteten av de medikamentene (atropin, toksogonin, diazepam) som benyttes i Norge i dag er sammenlignet med to andre fremtidige aktuelle og alternative behandlingsregimer mot 2-4 LD₅₀ doser av nervegassen soman. Det ene behandlingsregimet består av atropin, oksimet HI-6 og avizafon (vannløselig diazepam), mens det andre regimet er et eksperimentelt regime studert i Storbritannia gjennom noen år og består av medikamentene skopolamin, HI-6 og fysostigmin.

Denne studien på rotter viser at de tre motmiddelregimene administrert to ganger, 1 og 5 minutter etter nervegasseksponering, forhindret eller terminerte epileptiform aktivitet i hjernen innen 10 minutter. Videre bidro de tre regimene til økt overlevelse i ulik grad hvor skopolamin, HI-6 og fysostigmin regimet var mest effektivt etterfulgt av atropin, HI-6, avizafon regimet og deretter av atropin, toksogonin og diazepam regimet. Profylakse økte overlevelse ved bruk av atropin, HI-6, avizafon regimet, men ikke ved bruk av atropin, toksogonin, diazepam regimet i disse forsøkene på rotte. Hvis det norske regimet atropin, toksogonin, diazepam ble gitt tre ganger (1, 5 og 9 minutter) etter soman (3 LD₅₀) eksponering uten bruk av profylakse ble dette resultatet for overlevelse ikke forbedret.

Resultatene fra denne studien isolert viser at de medisinske motmidlene som er i bruk i Norge er mindre effektive enn resultatene ved bruk av kombinasjonen atropin, HI-6, avizafon. Bruk av kombinasjonen skopolamin, HI-6, fysostigmin gir også beskyttelse selv uten profylakse, men her vil det antagelig være nødvendig med øyeblikkelig administrasjon av medikamentene ved eksponering for nervegassen soman. Dette betyr at det terapeutiske vinduet kan være for lite til at denne kombinasjonen av legemidler er realistisk i bruk i felt. Dette må imidlertid undersøkes nærmere i dyreforsøk. Resultatene i denne studien underbygger samlet de anbefalinger, som foreligger i enkelte andre NATO-land, at atropin, HI-6 og avizafon sammen med profylakse gir en mer effektiv beskyttelse mot nervegassen soman enn det nåværende norske behandlingsregime.

English summary

The Norwegian Armed Forces were the first in NATO to introduce emergency antidotes against nerve agents in autoinjectors. Autoinjectors in use in 2011 contain atropine, obidoxime (toxogonin), and diazepam. In 1989 pyridostigmine prophylaxis against the nerve agent soman was introduced in Norway. The purpose of such drugs is to enhance survivability and reduce injuries following exposure. Such drugs are supposed to be administered by the soldiers themselves or as buddy aid following specific procedures. More effective countermeasures against nerve agent poisoning are, however, needed because the current drugs in use do not protect the soldiers sufficiently. The central nervous system is particularly vulnerable. The purpose of the present study was to compare the antidotal capabilities of three different regimens in an animal model using Wistar albino rats; 1) atropine, obidoxime, diazepam, 2) atropine, HI-6, avizafone, and 3) scopolamine, HI-6, physostigmine against 2-4 LD₅₀ doses of the nerve agent soman. The results showed that each regimen administered two times (1 and 5 minutes after soman exposure) effectively prevented or terminated epileptiform activity within 10 minutes. The regimens, however, differed markedly in life saving capabilities with the scopolamine, HI-6, physostigmine regimen ranking highest, followed in descending order by the atropine, HI-6, avizafone and lastly by atropine, obidoxime, diazepam regimens respectively. Pretreatment with pyridostigmine increased the potency of the atropine, HI-6, avizafone regimen, but not the atropine, obidoxime, diazepam regimen. The latter regimen administered 3 times, 1, 5 and 9 minutes after soman exposure, did not ameliorate the insufficiency in this animal model. The scopolamine, HI-6, physostigmine regimen has excellent antidotal properties, but the very narrow therapeutic window (probably less than 1-2 minutes) makes this regimen unrealistic for use in a field situation. The atropine, HI-6, avizafone regimen constitutes a relatively efficacious therapy against soman intoxication, particularly when pyridostigmine is used as a pretreatment.

Innhold

	Forord	6
1	Bakgrunn	7
2	Kort oversikt over medisinske motmidler	8
2.1	Profylakse mot nervegass	9
2.2	Akuttmedisinsk behandling av nervegassforgiftning	9
2.2.1	Atropin og oksim	9
2.2.2	Benzodiazepiner	9
2.2.3	Medikamenter i bruk i andre land og fremtidig bruk av medikamenter	10
3	Innledning	12
3.1	Formål	14
4	Metoder	15
4.1	Dyr	15
4.2	Kirurgi	15
4.3	Legemidler og nervegass	15
4.4	Histologi	16
4.5	Elektroencephalografi (EEG)	16
4.6	Observasjon av dyrene	16
4.7	Evaluering av nevropatologi	16
4.8	Statistikk	17
4.9	Måling av AChE aktivitet	17
5	Resultater	17
5.1	Eksposering for soman og medisinsk behandling	17
5.2	Restitusjon og kroppsvekt	20
5.3	AChE og ChE målinger	21
5.1	Histologi	22
6	Diskusjon	24
7	Konklusjon	28
	Referanser	29
	Forkortelser	36

Forord

I Norge benyttes profylakse (pyridostigmin tabletter) og to typer autoinjektorer (atropin og toksogonin i en injektor og diazepam i en annen injektor). Disse legemidlene øker overlevelse og reduserer skader på mennesker etter eksponering for flere av nervegassene. Atropin/toksogonin autoinjektoren ble innført i Norge på 1970-tallet og Norge var første land i NATO som innførte autoinjektorer mot nervegassforgiftning. Profylakse ble innført i 1989 for å øke overlevelse og forbedre muligheten for medisinsk behandling ved eksponering for nervegassen soman, som er spesielt vanskelig å behandle.

Disse legemidlene er likevel ikke tilstrekkelig effektive i å forhindre død eller utvikling av skader på enkelte av kroppens organer, hvor spesielt nervesystemet inkludert hjernen er sårbar. Legemidlene er primært utviklet for å redusere dødelighet etter eksponering for nervegasser. FFI har derfor gjennomført en studie for å sammenligne det medikamentregimet som er i bruk i Norge med et nytt alternativt medikamentregime, som kan være aktuelt å innføre i flere NATO-land, og med et eksperimentelt medikamentregime som har vært studert i Storbritannia gjennom noen år. Disse to nye regimene omfatter bruk av hhv atropin, HI-6 og avizafon, og skopolamin, HI-6 og fysostigmin.

Denne rapporten er utarbeidet under CD&E oppdraget ”Test og evaluering av autoinjektorer og medikamenter for utvikling av nytt konsept for medisinsk behandling ved nervegassforgiftning” (EP1154) for perioden 1. oktober 2010 – 31. desember 2011. Rapporten omtaler dyre-eksperimentelle forsøk på albino rotter hvor tre forskjellige medikamentregimer mot nervegassforgiftning er sammenlignet med og uten forbehandling med pyridostigmin profylakse.

1 Bakgrunn

Kjemiske stridsmidler¹ ble første gang brukt i stor skala under 1.verdenskrig. Omkring 1,3 millioner mennesker ble skadet, og 100 000 personer døde av slik bruk (Aas, 1999; 2002; Hilmas et al., 2008). Under den 2.verdenskrig ble det ikke brukt kjemiske våpen, bortsett fra begrenset japansk bruk av fosgen og sennepsgass i Kina. På 1980-tallet brukte Irak kjemiske våpen både mot Iran og mot kurdere i Irak (UN Security Council Documents, 1984; 1986; 1988; Waters, 1990). FNs Spesialkommisjon (UNSCOM) dokumenterte (1991-1998) et omfattende program for produksjon av flere typer masseødeleggelsesvåpen inkludert nervegasser i Irak (Aas, 1997; Pearson, 1999). Spekteret av trusselstoffer blir stadig mer omfattende på grunn av forskning og utvikling innenfor kjemisk- og farmasøytisk industri med blant annet utvikling av nye kjemiske produkter og målrettede nye legemidler (Aas, 2003b). Foruten bruk på norsk territorium vil slike trusselstoffer kunne bli brukt mot norsk personell i tjeneste utenlands (Aas, 2002). Nervegass som terrorvåpen med effektiv virkning ble vist i Japan av sekten Aum-Shinrikyo i 1994 og 1995 (Morita et al., 1995; Okumura et al., 1996; Otomi et al., 1996). Det mest kjente angrepet var mot undergrunnsbanen i Tokyo, hvor 12 personer ble drept og mange skadet. Årsaken til at antall døde og skadede var lavt, er trolig det faktum at terroristene ikke behersket teknologi for effektiv spredning av nervegass. Etter terrorangrepet i Oslo 22. juli 2011 ble det klart at det i manifestet som den terrortiltalte har forfattet og lagt ut på internettet er omtalt bruk av blant annet kjemiske stridsmidler, inkludert virkningen av nervegasser.

Terrorangrep mot sivile er ett av flere scenarier hvor kjemiske stridsmidler kan bli tatt i bruk. Ved bruk mot sivile vil ikke profylaktiske motmidler være tatt i bruk før eksponering, og motmidler i form av autoinjektorer vil av praktiske årsaker ikke kunne bli tatt i bruk før noe tid etter eksponering. Tiden fra eksponering til medisinerer vil kunne variere, men vil antakelig på bakgrunn av gjennomførte øvelser overstige 30 minutter for de fleste siden det vil ta tid å bringe motmidler ut til et skadested. Dette innebærer at motmidler må ha svært god virkning for å kunne redusere personskader og antallet døde. Ved militær bruk av kjemiske stridsmidler kan det ha blitt gitt ordre til militært personell om bruk av profylakse hvis trusselsituasjonen skulle tilsi bruk av nervegasser. Dette øker muligheten for effektiv virkning ved bruk av autoinjektorer etter eksponering. Likevel må effekten av de medisinske motmidlene i autoinjektorene bli bedre, siden nåværende medikamenter har begrenset virkning mot enkelte nervegasser.

Sannsynligheten for at kjemiske stridsmidler vil bli brukt i stor skala i en militær konflikt, som under den kalde krigen er redusert betydelig siden Kjemivåpenkonvensjonen trådte i kraft i 1997 (www.opcw.org). OPCW (Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons) har det internasjonale ansvaret for å følge opp med kontroll av de 188 land som pr 15. desember 2011 har ratifisert denne avtalen. Dette omfatter kontroll av sivil industri så vel som kontroll av destruksjon av militære lagre av eksisterende kjemiske stridsmidler.

¹ Et kjemisk våpen er en våpenbærer som inneholder ett eller flere kjemiske stridsmidler. Kjemiske stridsmidler er en begrenset gruppe trusselstoffer, vanligvis væsker, som er spesielt velegnet for bruk i en våpenbærer.

Det er 7 land som ikke er medlemmer av Kjemivåpenkonvensjonen og derved ikke underlagt internasjonal kontroll; Angola, Egypt, Israel, Myanmar, Nord-Korea, Somalia og Syria (www.opcw.org).

2 Kort oversikt over medisinske motmidler

Forsvaret innførte alt tidlig på 1970-tallet bruk av autoinjektorer, som inneholder atropin og oksim (toksogonin/obidoksim). Dette var et viktig nytt hjelpemiddel i det medisinske forsvar mot nervegassforgiftning, da dette ga mulighet for rask administrering av medikamentelle motmidler. Autoinjektoren ble primært utviklet for bruk av soldater ute i felt etter eksponering for nervegass. Målsettingen var den gang å innføre effektive medisinske motmidler mot nervegassene tabun og sarin, som ble ansett å utgjøre en alvorlig trussel mot Forsvaret.

På bakgrunn av den endrede trusselsituasjon før Golfkrigen i 1991 innførte Forsvaret i 1989 vernetabletter mot nervegassforgiftning (pyridostigmin bromid) etter anbefaling fra FFI (Figur 2.1). Dette ble innført pga at eksisterende autoinjektorer ikke ga tilstrekkelig effektiv beskyttelse, hvis soldater skulle bli eksponert for nervegassen soman. Soman utgjorde sammen med Russisk VX (VR) og sarin lagrene av deklarererte nervegasser i det tidligere Sovjetunionen (Pearson og Magee, 2002). Disse kjemiske våpen er nå lagret i Russland og prosessen med destruksjon av disse lagrene er i gang i hht krav i Kjemivåpenkonvensjonen. Dette skjer under kontroll av OPCW.



Figur 2.1 Vernetabletter og autoinjektorer i bruk i Forsvaret 2011. Vernetabletter (A) mot nervegass. Autoinjektorene inneholder diazepam (B), og atropin og toksogonin i løsnings (C). Soldater har utlevert 3 stk av atropin/oksim injektoren og én autoinjektor med diazepam.

I 2003 anskaffet Forsvarets Sanitet, etter anbefaling fra FFI, separate autoinjektorer som inneholder 10 mg diazepam (Figur 2.1). Disse autoinjektorene er beregnet for bruk av soldater som har blitt utsatt for nervegass og skal brukes ved alvorlige forgiftninger. Disse injektorene vil forbedre beskyttelsen av sentralnervesystemet etter eksponering for nervegass, men beskyttelsen er ikke tilstrekkelig effektiv for å hindre utvikling av senskader.

2.1 Profylakse mot nervegass

Vernetabletter mot nervegassforgiftning (Figur 2.1) inneholder pyridostigmin bromid. Pakken med tabletter er beregnet for én ukes forbruk og inneholder 21 tabletter á 30 mg pyridostigmin bromid (tre tabletter pr døgn) og skal tas på ordre *før* et angrep med nervegass. Dette ble innført primært for 1) å gi soldater en mulighet for å overleve en dødelig dose (LD_{100}) med nervegassen soman, 2) å forlenge soldatenes overlevelsestid slik at medisinsk behandling kan bli gitt, 3) forhindre en stor reduksjon i stridsevnen som oppstår når en utsettes for nervegass og 4) å overleve flere dødelige doser nervegass forutsatt at adekvat medisinsk behandling blir gitt etter eksponering.

Pyridostigmin profylakse virker ved å hemme reversibelt acetylkolinesterase (AChE) enzymet i de perifere vev og ikke ved å beskytte dette enzymet i det sentrale nervesystem; hjernen (CNS). Når AChE er hemmet av en reversibel hemmer, vil den del av enzymet som er hemmet være adekvat beskyttet ved en eksponering for nervegass. Etter en nervegassforgiftning vil dette enzymet spontant kunne reaktiveres og derved bli fysiologisk funksjonelt og hydrolysere acetylkolin. Derved reduseres den kolinerge overstimuleringen som er karakteristisk for nervegassforgiftning og som gir typiske symptomer på forgiftning (Aas og Jacobsen, 2005; Aas, 2006).

2.2 Akuttmedisinsk behandling av nervegassforgiftning

2.2.1 Atropin og oksim

Autoinjektorene i Forsvaret inneholder atropin (2 mg) og toksogonin (220 mg). Atropin blokkerer muskarine kolinerge reseptorer og toksogonin og andre oksimer virker hovedsakelig ved å reaktivere nervegasshemmet AChE i større eller mindre grad. Begge disse legemidlene er helt sentrale for å redusere den kolinerge overstimulering som skjer ved nervegassforgiftning (Aas og Jacobsen, 2005). Det er videre vist at oksimer kan ha andre gunstige egenskaper som blant annet å redusere frisetting av acetylkolin fra kolinerge nerver (Øydvin et al., 2005) og blokkere kolinerge reseptorer for acetylkolin (Tattersall, 1993).

2.2.2 Benzodiazepiner

Mekanismene for beskyttelse ved bruk av benzodiazepiner mot nervegass er ikke fullt ut forstått, men det er vist at bruk av diazepam gir beskyttelse mot epileptiforme kramper og skader i sentralnervesystemet ved eksponering for både nervegasser og enkelte insektmidler (McDonough og Shih, 1997; McDonough et al., 1999). Diazepam brukes for å redusere spontant utløste lokale anfall i sentralnervesystemet (hjernen), slik at disse anfallene ikke spres i det nevronale nettverket av nerveceller i hjernen til globale anfall med ledsagende konvulsjoner. Molekylært fører bruk av diazepam til økning av klorid-ion transporten over γ -amino smørsyre (GABA) reseptorene i hjernen. Diazepam forsterker derfor den hemmende effekten GABA har på nevroner i nervesystemet. Benzodiazepinreseptorer, hvor diazepam aktiverer bestemte reseptorseter, er en integrert del av GABA reseptorene.

Diazepam bør administreres umiddelbart etter nervegass-forgiftning (McDonough og Shih, 1997; Lallement et al., 1998; Aas og Jacobsen, 2005). Auto-injektoren i bruk i Norge inneholder 10 mg diazepam.

2.2.3 Medikamenter i bruk i andre land og fremtidig bruk av medikamenter

Flere NATO-land og andre Skandinaviske land bruker tilsvarende medikamenter som Norge i profylakse og behandling (Tabell 2.1). De fleste land benytter pyridostigmin profylakse. Alle land benytter atropin som antikolinergikum og en hemmer av kolinerge muskarine reseptorer. Valg av oksim varierer fra land til land, men er ofte historisk nasjonalt betinget mer enn valg av det mest effektive oksimet. Effektiviteten til oksimene varierer mht reaktivering og effektivitet i medisinsk behandling av nervegassforgiftning. HI-6 er det oksimet som vurderes å være det mest bredspektrede oksimet og som antagelig flere land kommer til å innføre i overskuelig fremtid. Sverige, Canada og Den Tsjekkiske Republikk, samt OPCW bruker i dag allerede dette oksimet, selv om klorid-saltet av oksimet som har vært i bruk inntil nå ikke er optimalt på grunn av liten løselighet i væske ved lave temperaturer (Aas, 2000b; Krummer et al., 2002). Dette betyr at det kan være et problem å bruke dette oksim-saltet under kalde klimatiske forhold. USA har alt besluttet å innføre MMB-4, som allerede er i bruk i Den Tsjekkiske Republikk, i løpet av noen år, selv om det i litteraturen er informasjon som tyder på at HI-6 (dimetansulfonatsaltet) er et mer effektivt oksim i lave doser enn hva som er vist for MMB-4 (Worek et al., 2010; for oversikt se Lundy et al., 2011). Både HI-6 og MMB-4 er generelt ansett å være mer effektive enn andre oksimer i bruk (Lundy et al., 2011). Dimetansulfonatsaltet av oksimene vil erstatte kloridsaltet ved fremtidig bruk.

Land	Profylakse ^a	Autoinjektor I ^b		Autoinjektor II ^c
Norge	Pyridostigmin	Atropin	Toksogonin	Diazepam
USA	Pyridostigmin	Atropin	2-PAM	Diazepam
Canada	Pyridostigmin	Atropin	HI-6	Diazepam
Storbritannia	Pyridostigmin	Atropin	P2S	Avizafon
Tyskland	Pyridostigmin	Atropin	Toksogonin	
Frankrike	Pyridostigmin	Atropin	2-PAM	Avizafon
Nederland	Pyridostigmin	Atropin	Toksogonin	Avizafon
Belgia	Pyridostigmin	Atropin	Toksogonin	
Italia	Pyridostigmin	Atropin	Toksogonin	Diazepam
Spania	Pyridostigmin	Atropin	Toksogonin	Diazepam
Danmark		Atropin	Toksogonin	
Polen		Atropin	P2S	Diazepam
Den Tsjekkiske Republikk	PANPAL ^d TRANSANT ^e	Atropin	Toksogonin MMB-4	Diazepam
Sverige	Pyridostigmin ^f	Atropin Atropin ^g	HI-6 Toksogonin	Diazepam
Finland	Pyridostigmin	Atropin	Toksogonin	

Tabell 2.1. Oversikt over bruk av medikamenter i profylakse og i autoinjektorer i forskjellige land i og utenfor NATO. Informasjonen er dels basert på informasjon direkte til P. Aas og dels på internasjonalt publisert informasjon (Aas, 2000; Aas, 2003a; Aas et al., 2009; Bajgar, 2009, Bajgar et al., 2009).

^a 30 mg 3 ganger pr døgn. Antall døgn varierer fra land til land

^b 2 mg atropin og 150-220 mg toksogonin, 350-600 mg 2-PAM eller P2S, og 500 mg HI-6 i hver injektor. Antall autoinjektorer varierer fra land til land og hvorvidt medikamentene administreres i en eller flere injektorer, og hvorvidt medikamentene er i ett eller flere kamre i injektorene. Nåværende HI-6 klorid salt vil bli byttet ut med dimetansulfonatsalt i fremtidige injektorer

^c 10 mg diazepam eller ekvivalent mengde avizafon (vannløselig diazepam)

^d PANPAL består av pyridostigmin, benactyzin og trihexyfenidyl

^e TRANSANT er et plaster inneholdende HI-6 for hudapplikasjon

^f Sverige har terminert bruk av tilleggsprofylakse med diazepam

^g Færre autoinjektorer med atropin/toksogonin enn atropin/HI-6. Atropin/toksogonin injektorer er nyanskaffet siden HI-6 autoinjektorer for tiden ikke er kommersielt tilgjengelige og nåværende injektorer med HI-6 har utgått på dato

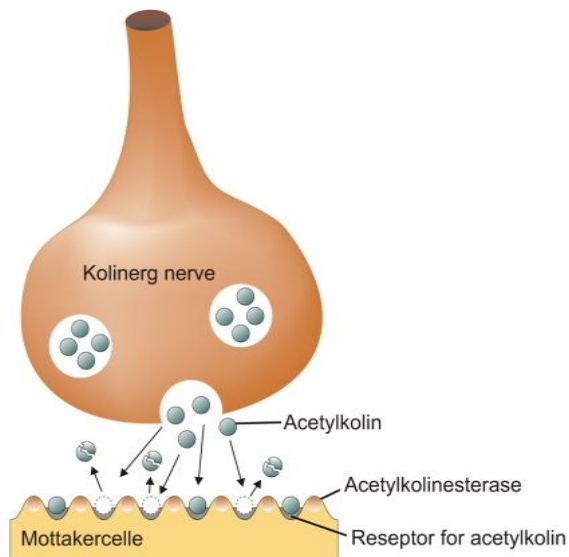
Det er godt dokumentert at toksogonin er mer effektivt enn HI-6 i å reaktivere tabun-hemmet AChE og enzym hemmet med organofosfat insektmidler, mens HI-6 er mer effektivt i beskyttelse mot nervegassen soman (Rousseaux og Dua, 1989; Lundy et al., 2011). Dette kan skyldes andre effekter enn direkte reaktivering av AChE enzymet (Worek et al., 1994). 2-PAM og P2S er de minst effektive oksimer mot både insektmidler og nervegasser. HI-6 har en forholdsvis lav giftighet sammenlignet med andre oksimer (Clement, 1981; Hamilton og Lundy, 1989; Kusic et al., 1985; van Helden et al., 1992, Lundy et al., 2011), men en ulempe er mangel på kjemisk stabilitet i vandig løsning. Dette krever at HI-6 saltet lagres i et eget tørt kammer i autoinjektorene separat fra atropinløsningen og et eventuelt innhold av avizafon (Thiermann et al., 1996). HI-6 og enkelte andre oksimer som inneholder et eller flere kvarternære nitrogen atomer transporteres kun i liten grad over blod-hjernebarriæren. I noen publiserte studier er det vist at oksimer vil kunne passere over blod-hjernebarriæren etter systemisk administrasjon og gi en konsentrasjon av oksim også i hjernen selv om denne er forholdsvis lav. Det kan ikke utelukkes at en lav konsentrasjonen i hjernen i forhold til i plasma kan ha en terapeutisk virkning (Cassel og Forbraey, 1996; Ligtenstein og Kossen, 1983). Toksogonin på den annen side transporteres kun i liten grad over barriæren (Lorke et al., 2007).

I fremtiden er det mulighet for at kombinasjoner av oksimer, som HI-6 og toksogonin, kan bli tatt i bruk for å kunne gi medisinsk behandling av et bredere spekter av nervegasser (Worek et al., 2007). Flere land har tatt i bruk et benzodiazepin som for eksempel diazepam i en separat autoinjektor. Andre land har innført avizafon, som er en vannløselig kjemisk analog av diazepam. Bruk av avizafon muliggjør bruk av injektorer hvor alle medikamentene er samlet i en og samme injektor i ett eller flere kamre. Bruk av diazepam eller avizafon eller andre benzodiazepiner er nødvendig for å redusere skader forårsaket av nervegasser i hjernen. USA vil antakelig ta i bruk benzodiazepinet midazolam. Et fremtidig autoinjektorregime, som inneholder atropin, HI-6 og et benzodiazepin (diazepam, avizafon eller midazolam) er i dag bare i bruk i Canada, men vurderes som aktuelt av flere NATO-land (Aas, 2003a).

I tillegg finnes det i norske sykehus andre legemidler som kan brukes i medisinsk behandling ved knapphet på de vanlige legemidlene brukt ved nervegassforgiftning. En slik situasjon kan oppstå ved en akutt hendelse med et høyt antall nervegassskadede pasienter. En oversikt over eksempler på slike legemidler er gitt i FFI-rapport 2009/01858 (Aas et al., 2009). Denne rapporten er fordelt til større sykehus i Norge.

3 Innledning

Nervegasser tilhører gruppen organofosfatforbindelser og er av de giftigste kjemiske stridsmidler som er produsert. Nervegasser virker ved å hemme irreversibelt enzymet acetylkolinesterase (AChE), som er det enzymet som hydrolyserer neurotransmitteren acetylkolin. Akkumulering av acetylkolin i synapsekløften resulterer i økt stimulering av muskarine og nikotine reseptorer i det kolinerge nervesystem (Figur 3.1). Ved en nervegassforgiftning vil symptomene være avhengig



Figur 3.1 Figuren viser en kolinerg nervecelle som produserer og frisetter acetylkin. Disse nervecellene er det primære målet for nervegasser. Acetylkin er signalmolekylet (nevrottransmitter) i disse nervecellene. Etter frisetting fra nervene bindes acetylkin til reseptorer for acetylkin. Reseptorene er enten muskarine eller nikotine reseptorer. Etter bindingen og aktivering av reseptorene brytes acetylkin ned av acetylkolinesterase, som hemmes av nervegasser. Ved nervegassforgiftning øker derfor konsentrasjonen av acetylkin og derved stimuleringen av reseptorene.

av konsentrasjon man blir eksponert for og vil gi følgende utslag: Miose, økt spyttsekresjon, pusteproblemer, skjelving, anfall, kramper, koma og død (Aas og Jacobsen, 2005). Forhøyede nivåer av acetylkin i hjernen er antakelig årsaken til de innledende sentralnervøst utløste anfall (McDonough og Shih, 1997; Lallement et al., 1992), mens de varige anfallene antakelig er knyttet til økt glutamaterg aktivitet som fører til nevronale skader. Slike skader oppstår primært i hippocampus området, amygdala, piriform korteks og entorinale korteks (McDonough og Shih, 1997; Carpentier et al., 1991).

Medisinsk behandling av nervegassforgiftning baseres i mange lands forsvar på bruk av profylakse (vernetabletter mot nervegass) (Aas, 2003a; Aas og Myhrer, 2003). Dette medikamentet er et karbamat som hemmer AChE enzymet i kroppen – det samme enzymet som hemmes av nervegasser. Dosen som forsvarets personell bruker er forholdsvis lav og hemmer kun 15-40 % av normalnivået i plasma og bindingen av profylakse til enzymet er reversibel. En slik hemming av enzymet i blod er uproblematisk for de fleste for opprettholdelse av normale kroppsfunksjoner og hindrer at nervegasser hemmer enzymet 100 %. Pyridostigmin er et ladet molekyl og penetrerer ikke blod-hjerne barriæren og forventes derfor ikke å beskytte hjernen mot nervegass. Den medisinske behandlingen etter eksponering for nervegass baseres på bruk av en kolinerg muskarin reseptorblokker (atropin) sammen med et oksim (toksogonin, P2S, 2-PAM, HI-6, MMB-4 med flere) (Dawson 1994; Abraham et al., 2002; Kassa 2002; Aas og Myhrer, 2003; Newmark, 2004; 2005; 2007; Sidell et al., 2008; Aas et al., 2009). Disse medikamentene hemmer henholdsvis virkningen av acetylkin på muskarinreseptorene og reaktiverer

nervegasshemmet AChE i perifere vev (Aas, 2003a). Denne kombinasjonsbehandlingen kan øke overlevelse etter nervegasseksponering betydelig, men i mindre grad redusere nervegassinduserte anfall i hjernen. Slike anfall kan resultere i utvikling av hjerneskader, som vil kreve en mer intensivt oppfølgende medisinsk behandling. Derfor har flere land, inkludert Norge, utstyrt forsvarets personell med en separat autoinjektor som inneholder diazepam.

Bakgrunnen for gjennomføringen av denne dyrestudien var å få et bedre vitenskapelig grunnlag for å vurdere tre ulike autoinjektoralternativer etter nervegassstudier på dyr. Studien sammenligner for det første det eksisterende norske autoinjektorregimet (atropin, toksogonin, diazepam) med et mulig nytt regime bestående av atropin, HI-6 og avizafon. For det andre omfatter denne studien også en undersøkelse og sammenligning av et helt nytt prinsipp for terapi som er foreslått av britiske forskere ved Dstl i Porton Down. Denne terapien medfører bruk av skopolamin, HI-6 og fysostigmin. Grunnlaget for dette forslaget er basert på studier i marsvin som ble forbehandlet profylaktisk i 6 dager med fysostigmin og skopolamin gjennom implanterte miniosmotiske pumper under huden. Denne behandlingen viste å gi god beskyttelse mot dødelighet og redusert yteevne etter eksponering for flere forskjellige nervegasser uten annen medisinsk behandling. I samme studie ble det også vist at kontinuerlig behandling med fysostigmin og skopolamin i 24 timer etter nervegasseksponering ikke forverret nervegassforgiftningen, men derimot viste en gunstig effekt på overlevelse og yteevne (Wetherell et al., 2002). I en oppfølgende studie viste de britiske forskerne at en kombinasjon av fysostigmin, skopolamin og HI-6 administrert 1 minutt etter nervegassforgiftning gir god beskyttelse mot den dødelige effekten av nervegassene tabun, sarin, soman, cyclosarin og VX (Wetherell et al., 2006; 2007). Denne terapien ble derfor foreslått å kunne representere et nytt alternativ og en neste generasjon av motmidler mot nervegasser, fordi det i lang tid har vært en målsetting i Storbritannia å utvikle motmidler for bruk etter eksponering som er mindre avhengig av bruk av profylakse og som samtidig kan redusere det nødvendige antallet autoinjektorer fra 3(atropin/oksim) + 1 (diazepam eller avizafon) autoinjektorer til kun én injektor med motmidler (Wetherell et al., 2007).

3.1 Formål

Formålet med denne studien var å sammenligne den antikonvulsive effekten og evnen til å redusere død av tre behandlingsregimer bestående av 1) atropin, toksogonin og diazepam, 2) atropin, HI-6 og avizafon og 3) skopolamin, HI-6 og fysostigmin på albino rotter forgiftet med 2-4 LD₅₀ doser av nervegassen soman ved subkutan injeksjon. Den medisinske behandlingen var planlagt å bli gitt om nødvendig tre ganger 1, 5 og 9 minutter etter soman forgiftning. Regimet med skopolamin, HI-6 og fysostigmin var forutsatt og kun bli gitt innen ett minutt etter forgiftning, men for å kunne sammenligne regimene ble all behandling gitt likt, dvs inntil tre ganger. Bruk av regimet med atropin, toksogonin og diazepam og regimet med atropin, HI-6 og avizafon forutsetter bruk av pyridostigmin som profylakse. En tilleggsstudie ble gjennomført for å undersøke betydningen av profylakse etterfulgt av behandling som beskrevet over. Nivået av AChE hemming etter nervegasseksponering ble målt i både hjerne, erytrocytter og i plasma i separate eksperimenter hvor rottene ble avlivet 2 timer etter somaneksponering og medisinsk behandling.

4 Metoder

4.1 Dyr

Wistar rotter, hanner (300-330 g) fra Taconic Breeding Laboratories i Danmark ble brukt i studien. Dyreforsøkene var godkjent av Forsøksdyrutvalget. Rottene fikk implantert kortikale elektroder i hjernen og hadde en rekonvalesensperiode på 7 dager før forsøk med nervegasser og legemidler. Totalt ble 82 rotter eksponert for nervegassen soman og tilført legemidler. Atten rotter uten elektroder ble eksponert for soman og legemidler før måling av AChE hemming. I kontrollforsøk ble det brukt 6 rotter som fikk fysiologisk saltvann i stedet for nervegass. Rottene ble oppstallet i individuelle bur og hadde fri tilgang på vann og standard rottefor. Rottene ble håndtert individuelt i tre dager før operative inngrep og tilsvarende tre dager etter inngrep, hvor de kunne bevege seg fritt på en åpen bordplate (80x60 cm) i tre minutter pr dag. Vivariet har et kontrollert klima på 21 °C og ble belyst i 12 timer pr døgn fra kl 0700 til 1900.

4.2 Kirurgi

Rottene ble gitt anestesi intraperitonealt (i.p.) med diazepam (4.5 mg/kg) og fentanyl fluanison (2 mg/kg). Rustfrie stålskruer ble implantert over parietalcortex. Skruen i den venstre hemisfære ble senket 1 mm lenger ned i skallen enn den på høyre side og fungerte som jording. Skruene ble festet med dentalsement.

4.3 Legemidler og nervegass

Legemidlene brukt i denne studien er valgt ut basert på tidligere studier ved FFI og ved andre laboratorier i undersøkelser av antikonvulsive legemidler og deres virkning mot nervegass-induserte konvulsjoner hos rotter (Clement og Broxup, 1993; Kassa og Koupilova, 2000; McDonough og Shih, 1993; Myhrer et al., 2004, 2011). Følgende legemidler og doser ble brukt: Atropin sulfat 100 mg/kg, skopolamin 1 mg/kg, HI-6 dimetansulfonat 125 mg/kg, toksogonin diklorid 36 mg/kg, diazepam 10 mg/kg, avizafon 15 mg/kg, fysostigmin salicylat 0.1 mg/kg, pyridostigmin bromide 0.1 mg/kg. Alle legemidlene ble kjøpt fra Sigma (St Louis, MO, USA) unntatt HI-6 DMS (gave fra Defence Research and Development, Canada), avizafon (gave fra Dstl, Porton Down, Storbritannia) og toksogonin fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Legemidlene ble løst i 0.9 % NaCl og ble administrert intramuskulært (i.m.). Injeksjonsstedet varierte mellom venstre og høyre muskel på bakbenet. Følgende legemidler ble blandet for samlet injeksjon: Atropin og toksogonin; atropin og HI-6; skopolamin og HI-6. Diazepam, avizafon og fysostigmin ble injisert separat.

Nervegassen soman ble administrert subkutan (s.c.) i følgende doser: 2 LD₅₀ (160 µg/kg), 3 LD₅₀ (240 µg/kg), 4 LD₅₀ (320 µg/kg) (Sterri et al., 1980).

4.4 Histologi

Rottene ble avlivet 7 dager etter somaneksponering, bortsett fra når tilstanden til dyrene krevde en tidligere avling. De ble anestisert og perfundert intrakardialt med en 10 % formalinløsning. Hjernene ble deretter fiksert i 10 % formalin i minst 24 timer, dehydrert, og støpt inn i parafin. Hjernene ble snittet frontalt i 5 µm tykke snitt og tørket i en inkubator (37 °C) i 12 timer før de ble farget med Fluoro-Jade B (Schmued og Hopkins, 2000). Siden Fluoro-Jade B er vurdert å være spesielt velegnet for å detektere nevronal degenerering (Schmued et al., 1997) ble denne fargemetoden valgt. Et degenererende nevron uttrykker sannsynligvis et basisk protein, siden det har en sterk affinitet til det sterkt sure Fluoro-Jade molekylet (Schmued et al., 1997). Denne Fluoro-Jade metoden er tidligere beskrevet i detalj (Schmued et al., 1997; Schmued og Hopkin, 2000). For å kunne skille klart mellom intakte uskadete og degenererende nerveceller ble snittene av hjernene også farget med 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydroklorid (DAPI) som gir en blå fluoriserende farge av cellekjerner. Slik farging av kjerner vil sees i alle levende celler. En 0.01 % løsning av DAPI (10 mg/100 ml destillert vann) ble laget og 2 ml av denne løsningen ble blandet med 98 ml av Fluoro-Jade B farge løsningen. Blåfargede normale nervecellekjerner kan visualiseres ved eksitasjon med ultrafiolett lys (330-380 nm) (Schmued og Hopkins, 2000). Fluoro-Jade B farging kan observeres med et blått eksitasjonsfilter, mens DAPI sees med et filtersett 49 med eksitasjon 365 nm og emisjon 445/50. Ett bilde ble lagt ovenpå et annet for å se begge samtidig. Et digitalt mikroskop med kamera (AxioCam, Zeiss, Jena, Tyskland) ble brukt for å lage bilder. Denne teknikken kan brukes slik at ulike elementer i bildet kan fremheves ved å endre kontrastene.

4.5 Elektroencephalografi (EEG)

Rottene ble koplet til en polygraf (Grass Model 79E) for registrering av elektriske signaler fra hjernen via en svivel. Registrering av EEG aktivitet hos rottene ble utført 10 min før injeksjon av soman for å få en baselinje, under utviklingen av anfall og etter avslutning av anfallene. I tillegg ble det utført et opptak av EEG aktivitet 24 timer etter eksponering for soman.

4.6 Observasjon av dyrene

Hver rotte ble observert for adferd og tegn på forgiftning etter somaneksponering. Fuktige lepper og nese ga indikasjon på hypersekresjon. Bevisstløshet eller koma ble vurdert å inntre når både opprettingsrefleks og øyereflekser var fraværende. Fullstendig inkapasitering ble definert ved immobilisering med begge bakbena strekt ut bakover og forbena bøyd inn under kroppen. Rottene ble observert kontinuerlig for utvikling av konvulsjoner og synlige tegn på forgiftning i de første 2-3 timene og deretter i 10 min ved 24 og 48 timer etter soman injeksjon.

4.7 Evaluering av nevropatologi

Et graderingssystem fra 0-4 (McDonough et al., 1995) ble brukt for å bestemme alvorligheten av nevronal hjerneskade i CA1 området i hippokampus, i basolaterale amygdala og i piriform korteks. Dette systemet var basert på omfanget av vevsskader i hjernen i %; 0: ingen skade, 1:

minimal skade, 1-10 %, 2: mild skade, 11-25 %, 3: moderat skade, 26-45 % og 4: alvorlig skade, >45 %. Hvert dyr ble gitt en total nevropatologiscoring uttrykt som gjennomsnittet av de 3 individuelle hjerneområdene. Kriteriene brukt for å karakterisere patologien var nevronal degenerasjon.

4.8 Statistikk

Statistiske analyser ble utført med Fishers "Exact Test" (Graph Pad Software, CA, USA) eller en ikke-parametrisk enveis ANOVA (Kruskal-Wallis) etterfulgt av en Dunns "Multiple Comparison Test", tohalet Mann-Whitney U-test brukt alene, eller tohalet t-test for uavhengige gjennomsnittsverdier.

4.9 Måling av AChE aktivitet

Acetylkolinesterase- (AChE) og kolinesterase- (ChE) aktiviteten ble målt i hjerne, erythrocytter og i plasma etter metoden til Molecular Probe (AmplexTM Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (A-12217) basert på bestemmelse av H₂O₂ ved bruk av Amplex red reagens (Zhou et al., 1997). AChE aktiviteten er uttrykt som pmol min⁻¹ mg protein⁻¹. AChE-aktivitet ble målt etter hemming av ChE-aktiviteten med ethopropazine (Todrik, 1954). Rottene ble inndelt i 3 grupper med 6 dyr i hver gruppe. Tid for overlevelse etter soman eksponering var 2 timer, mens rotter som viste sterke tegn på forgiftning ble avlivet før denne tiden.

5 Resultater

5.1 Eksponering for soman og medisinsk behandling

Etter eksponering for en soman dose på 2 LD₅₀, utviklet flere rotter i hver gruppe toniske eller kloniske konvulsjoner etter en periode på 3-5 min. To injeksjoner av hvert medikamentregime var tilstrekkelig for å hindre eller for å stanse anfall etter somaneksponering (Tabell 5.1) og ingen av dyrene viste tegn på epileptiform aktivitet 10 min etter soman. Dette er et mønster som ble observert gjennom hele denne studien. De rottene som fikk atropin, HI-6, avizafon eller skopolamin, HI-6, fysostigmin regimene hadde en signifikant lavere dødelighet enn rottene som fikk atropin, toksogonin, diazepam regimet (P=0.007, Fishers Exact Test).

Da soman dosen ble økt til 3 LD₅₀ reagerte de fleste rottene i både atropin, toksogonin, diazepam og atropin, HI-6, avizafon regimene med å utvikle kloniske eller toniske konvulsjoner etter 3-5 min (Tabell 5.2). Rottene som fikk enten atropin, HI-6, avizafon eller skopolamin, HI-6, fysostigmin hadde en signifikant høyere overlevelse enn rottene i atropin, toksogonin, diazepam gruppen (P<0.01). Siden alle rottene i den sistnevnte gruppen døde innen 2,5 timer etter soman eksponering ble rotter under dette behandlingsregimet ikke gitt 4 LD₅₀ av soman av etiske grunner. Figur 5.1 viser EEG mønsteret under overgangsfasen fra anfallsaktivitet i hjernen til opphør av epileptiform aktivitet. De EEG data som er vist er fra rotter som ble behandlet med atropin, HI-6, avizafon og viser at terminering av anfall kan oppnås etter injeksjon 4 min etter soman eksponering (Figur 5.1A) eller etter 2 injeksjoner 7 min etter soman (Figur 5.1B).

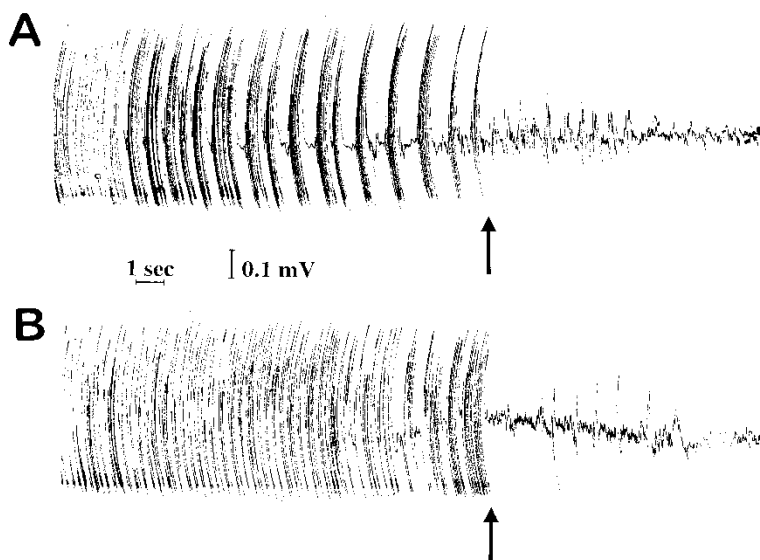
To injeksjoner ble likevel gitt til alle rottene for å behandle alle likt og for å hindre gjeninntreden av epileptiforme anfall.

Soman	N	Behandling 1 og 5 min etter soman	Kloniske eller toniske konvulsjoner 3-5 min etter soman	Epileptiform EEG 7-10 min etter soman	Dødelighet 24 timer etter soman (tid til død før 24 timer)
2 x LD ₅₀	8	Atropin (100 mg/kg) Toksogonin (36 mg/kg) Diazepam (10 mg/kg)	3/8	0/8	(1.5 – 4.5 timer, N=4) 6/8
2 x LD ₅₀	8	Atropin (100 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Avizafon (15 mg/kg)	3/8	0/8	0/8 *
2 x LD ₅₀	8	Skopolamin (1 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Fysostigmin (0.1 mg/kg)	3/8	0/8	0/8 *

Tabell 5.1 Antikonvulsiv og livsbevarende effekt av 3 forskjellige autoinjektorregimer i rotte eksponert for 2 LD₅₀ soman. Signifikant forskjellig fra atropin, toksogonin, diazepam regimet; *P=0.0070.

Soman	N	Behandling 1 og 5 min etter soman	Kloniske eller toniske konvulsjoner 3-5 min etter soman	Epileptiform EEG 7-10 min etter soman	Dødelighet 24 timer etter soman (tid til død før 24timer)
3 x LD ₅₀	8	Atropin (100 mg/kg) Toksogonin (36 mg/kg) Diazepam (10 mg/kg)	6/8	0/7	(6 min – 2.5 timer, N =8) 8/8
3 x LD ₅₀	8	Atropin (100 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Avizafon (15 mg/kg)	6/8	0/8	2/8 *
3 x LD ₅₀	8	Skopolamin (1 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Fysostigmin (0.1 mg/kg)	3/8	0/8	0/8 **

Tabell 5.2 Antikonvulsiv og livsbevarende effekt av 3 forskjellige autoinjektorregimer i rotte eksponert for 3 LD₅₀ soman. Signifikant forskjellig fra atropin, toksogonin, diazepam regimet; *P=0.0070, **P=0.0002.



Figur 5.1 EEG målinger fra parietal cortex hos 2 rotter som er blitt eksponert for en soman dose på 3 LD₅₀. A: Tre minutter (pil) etter første injeksjon av atropin, HI-6, avizafon viser at den epileptiforme aktiviteten ble stanset. B: To minutter (pil) etter den andre injeksjon av atropin, HI-6, avizafon viser at den epileptiforme aktiviteten stanset.

Etter eksponering for en soman dose på 4 LD₅₀ fikk majoriteten av rottene fullt utviklet tonisk-kloniske konvulsjoner 1-5 min etter soman injeksjon (Tabell 5.3). Dødeligheten var signifikant lavere i den gruppen som fikk skopolamin, HI-6, fysostigmin i forhold til den gruppen som fikk atropin, HI-6, avizafon (P=0.001). En rotte i skopolamin, HI-6, fysostigmin gruppen døde før behandlingen var gjennomført. En del rotter (ca 30 %) som fikk atropin, HI-6, avizafon utviklet hematom rundt injeksjonsstedet på bakbenet. En slik reaksjon ble ikke observert da dosen av de samme medikamentene var mye lavere, selv om rottene hadde blitt utsatt for tilsvarende doser av soman (Myhrer et al., 2006). I rotter som ikke fikk soman utviklet det seg tilsvarende hematom da atropin, HI-6, avizafon ble administrert. Den kritiske kombinasjonen viste seg å være atropin og avizafon i de dosene som ble brukt i dette forsøket.

Soman	N	Behandling 1 og 5 min etter soman	Tonisk-klonisk konvulsjoner 1-5 min etter soman	Epileptiform EEG 7-10 min etter soman	Dødelighet 24 timer etter soman (tid til død før 24timer)
4 x LD ₅₀	8	Atropin (100 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Avizafon (15 mg/kg)	6/8	0/8	7/8
4 x LD ₅₀	8	Skopolamin (1 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Fysostigmin (0.1 mg/kg)	7/8	0/7	(5.3 min, N=1) 1/8 *

Tabell 5.3 Antikonvulsiv og livsbevarende effekt av 2 forskjellige autoinjektorregimer i rotte eksponert for 4 LD₅₀ soman. Signifikant forskjellig fra atropin, HI-6, avizafon regimet; *P=0.0101.

Atropin, toksogonin, diazepam og atropin, HI-6, avizafon regimene er forutsatt å bli administrert etter profylaktisk bruk av pyridostigmin. I forsøkene med 3 LD₅₀ med soman var dosen av pyridostigmin 0.1 mg/kg. Tabell 5.4 viser resultatene fra kombinasjonsbruk av profylakse og medisinsk behandling. Rottene som fikk atropin, toksogonin, diazepam viste ikke forbedret overlevelse selv etter bruk av profylakse. De rottene som først fikk profylakse og deretter atropin, HI-6, avizafon hadde derimot en øket overlevelse i forhold til dyr uten profylakse (Tabell 5.2). I Forsvaret består autoinjektorregimet av 3 injektorer med atropin og toksogonin og én separat injektor med diazepam. Når en tredje injeksjon av disse medikamentene ble administrert til de rottene som hadde fått 3 LD₅₀ av soman økte ikke overlevelseshraten (Tabell 5.5).

5.2 Restitusjon og kroppsvekt

Restitusjonsfasen etter somanforgiftning og medisinsk behandling viste seg å være svært forskjellig mellom de tre gruppene av rotter som fikk ulik behandling. I de forsøkene hvor rottene fikk 2 LD₅₀ med soman, overlevde kun 2 rotter i 24 timer i atropin, toksogonin, diazepam gruppen og de var i en så dårlig forfatning at de ble avlivet av etiske årsaker. Rottene i den gruppen som fikk atropin, HI-6, avizafon var inkapasitert i 5 timer. Etter 24 timer kunne dyrene spise og drikke normalt, men deres måte å bevege seg på var unormal. Rottene i gruppen som fikk skopolamin, HI-6, fysostigmin var tilsynelatende uaffisert av somanforgiftningen. De var inkapasitert i ca 10 min før de startet normale bevegelsesmønstre.

Soman	N	Behandling 1 og 5 min etter soman	Kloniske eller toniske konvulsjoner 3-5 min etter soman	Epileptiform EEG 7-10 min etter soman	Dødelighet 24 timer etter soman (tid til død før 24timer)
3 x LD ₅₀	6	Atropin (100 mg/kg) Toksogonin (36 mg/kg) Diazepam (10 mg/kg)	3/6	0/6	(1.5 – 4 timer) 6/6
3 x LD ₅₀	6	Atropin (100 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Avizafon (15 mg/kg)	6/6	0/6	0/6 *

Tabell 5.4 Antikonvulsiv og livsbevarende effekt av 2 forskjellige autoinjektorregimer i rotte som er forbehandlet med pyridostigmin profylakse 20 min før eksponering for 3 LD₅₀ soman. Signifikant forskjellig fra atropin, toksogonin, diazepam regimet; *P=0.0022.

Soman	N	Behandling 1, 5 og 9 min etter soman	Kloniske eller toniske konvulsjoner 3-5 min etter soman	Epileptiform EEG 7-10 min etter soman	Dødelighet 24 timer etter soman (tid til død før 24timer)
3 x LD ₅₀	6	Atropin (100 mg/kg) Toksogonin (36 mg/kg) Diazepam (10 mg/kg)	3/6	0/6	(0.5 – 3 timer) 0/6

Tabell 5.5 Antikonvulsiv og livsbevarende effekt av 1 type autoinjektorregime, men administrert 3 ganger hos rotter eksponert for 3 LD₅₀ soman.

Etter 4 timer kunne de reise seg på bakbena. Tilsvarende mønstre i restitusjon ble også observert i de to gruppene som fikk atropin, HI-6, avizafon og skopolamin, HI-6, fysostigmin etter at de hadde fått en somandose på 3 LD₅₀. Da dosen av soman ble øket til 4 LD₅₀ døde 7 av rottene som fikk atropin, HI-6, avizafon og kun 1 rotte overlevde i 24 timer. Denne ble avlivet pga at den var i dårlig forfatning. Rottene som fikk skopolamin, HI-6, fysostigmin var derimot lite påvirket av somandosen på 4 LD₅₀. De kunne bevege seg 10 min etter forgiftning. Etter 2 timer var alle i live og kunne gå omkring i buret, dog med en noe ustø gange. Etter 24 timer, derimot, var dyrene i fin form og kunne drikke og spise.

Mønsteret i restitusjonsfasen ser ut til å bli reflektert i gjenvinning av kroppsvekt etter forgiftning (Tabell 5.6). Etter eksponering for en somandose på 3 LD₅₀ var det maksimale vekttapet på 8 % for gruppen som hadde fått atropin, HI-6, avizafon og 5 % for skopolamin, HI-6, fysostigmin gruppen. Dette vekttapet ble raskere kompensert for av skopolamin, HI-6, fysostigmin gruppen enn for atropin, HI-6, avizafon gruppen (Tabell 5.6). Vektøkningen var signifikant høyere for skopolamin, HI-6, fysostigmin gruppen i forhold til atropin, HI-6, avizafon gruppen når somandosene var 2 eller 3 LD₅₀ (t-test for uavhengige grupper, P<0.0001). Kompenseringen av vekttapet var tilnærmet fullstendig for skopolamin, HI-6, fysostigmin gruppen selv om soman dosen var 4 LD₅₀.(Tabell 5.6).

Behandling 1 og 5min etter soman	N	Soman (2 x LD ₅₀)	N	Soman (3 x LD ₅₀)	N	Soman (4 x LD ₅₀)
Atropin (100 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Avizafon (15 mg/kg)	7	95±0.5	5	92±1.6	0	-
Skopolamin (1 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Fysostigmin (0.1 mg/kg)	8	101±0.6 *	8	102±0.8 *	7	99±1.2

Tabell 5.6 Kroppsvekt til rotter 7 dager etter eksponering for soman i prosent (gjennomsnitt ±SEM) av vekten på dag én for eksponering. Signifikant forskjellig fra atropin, HI-6, avizafon regimet; *P<0.0001.

5.3 AChE og ChE målinger

I tabell 5.7 er nivåene av AChE og pseudokolinesterase (ChE) aktiviteten i blod og hjernevev etter eksponering til 2 LD₅₀ av soman og medisinsk behandling gitt. Rottene ble avlivet 2 timer etter somaneksponering. Enveis ANOVA viste en klar effekt på AChE aktiviteten i røde blodceller (H(3)=14.29, P=0.0008). AChE aktiviteten i skopolamin, HI-6, fysostigmin gruppen

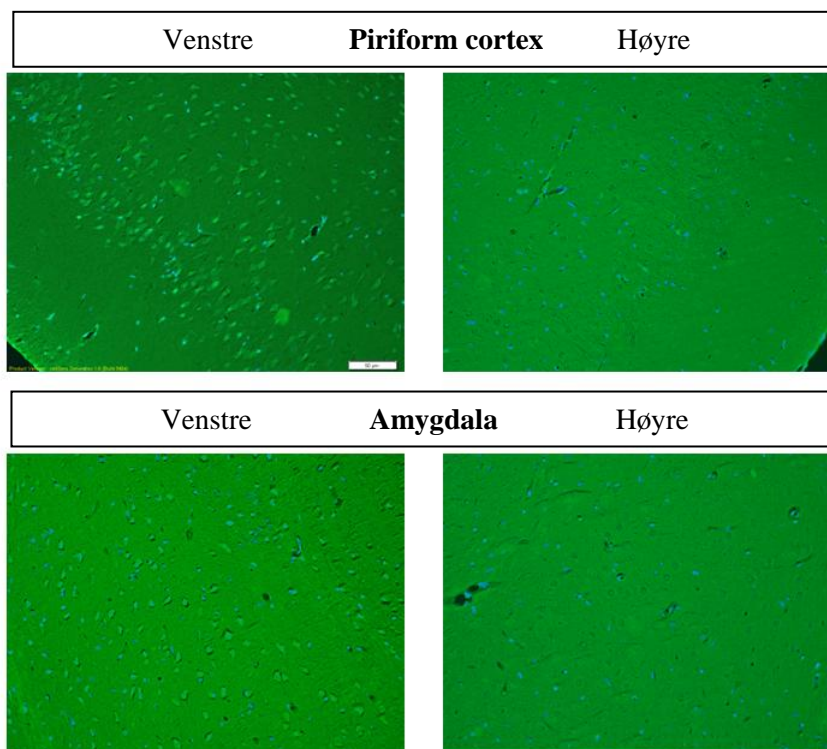
Behandling 1 og 5 min etter soman	N	AChE i røde blodceller	ChE i plasma	AChE i hjernehomogenat	ChE i Hjernehomogenat
		Median (range)	Median (range)	Median (range)	Median (range)
Atropin (100 mg/kg) Toksogonin (36 mg/kg) Diazepam (10 mg/kg)	6	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	15.6 (1.0-47.2)	2.9 (0.0-32.4)
Atropin (100 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Avizafon (15 mg/kg)	6	0.8 (0.0-1.2)	0.0 (0.0-2.7)	3.6 (2.7-8.7)	0.0 (0.0-3.0)
Skopolamin (1 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Fysostigmin (0.1 mg/kg)	6	4.8** (1.6-3.5)	4.7* (1.4-6.4)	7.5 (1.6-13.4)	5.2† (3.4-28.7)
Kontroll (for soman og behandling)	6	5.2 (2.65-7.0)	6.3 (4.6-7.3)	137.3 (58.3-235.2)	80.8 21.6-117.8

Tabell 5.7 Acetylkolinesterase (AChE)- og pseudokolinesterase (ChE) enzymaktiviteter i røde blodceller (erythrocytter), i plasma og i homogenat fra hjerne fra rotter eksponert for 2 LD₅₀ soman 2 timer før avlivning. Verdiene er oppgitt i pmol hydrolysert AChE eller ChE min⁻¹ mg protein⁻¹. Signifikant forskjell fra atropin, toksogonin, diazepam regimet; *P<0.01, **P<0.001. Signifikant forskjellig fra atropin, HI-6, avizafon regimet; †P<0.05.

var signifikant høyere enn i atropin, toksogonin, diazepam gruppen (P<0.001). ANOVA viste også en klar effekt av behandlingen på ChE-aktiviteten i plasma (H(3)=11.73, P=0.0028). Gruppesammenligning viste at skopolamin, HI-6, fysostigmin gruppen hadde signifikant høyere ChE aktivitet enn atropin, toksogonin, diazepam gruppen (P<0.001). Ingen effekt ble funnet for AChE aktiviteten i hjernehomogenatene (H(3)=4.22, P=0.1211). ANNOVA viste likevel en signifikant effekt på ChE aktiviteten in hjernehomogenat (H(3)=8.239, P=0.0163). ChE aktiviteten i skopolamin, HI-6, fysostigmin gruppen var signifikant høyere enn i atropin, HI-6, avizafon gruppen (P<0.05). Som vist i tabell 5.7 er verdiene for AChE og ChE aktivitetene i kontrollgruppen distinkt forskjellige fra de gruppene av dyr som er eksponert for soman, unntatt for AChE aktiviteten i røde blodceller og ChE aktiviteten i plasma i gruppen som har fått skopolamin, HI-6, fysostigmin.

5.1 Histologi

Til tross for at den farmakologiske behandlingen hindret eller terminerte den epileptiforme aktiviteten innen 10 min etter somanförgiftning hos alle rottene, ble det observert noe nevropatologi i indeksområdene piriform cortex og i amygdala, men ikke i hippokampus CA1 området (Tabell 5.8).



Figur 5.2 Snitt fra hjernen farget med DAPI/Fluoro-Jade B 7 dager etter somaneksponering (3 LD₅₀). Alle bildene er fra den samme rotten som var behandlet med skopolamin, HI-6, fysostigmin og som ikke hadde anfall. Nevronale skader kan observeres i den venstre hemisfære og kun i piriform cortex og i amygdala. Snittene observeres fra den kaudale enden (bakfra og fremover) av hjernen. Forstørrelse er 200x.

Fluoresensfarging (Fig. 5.2), som tegn på cellulær skade, ble observert i 53 % av rottene i piriform cortex og/eller i amygdala, men hovedsakelig i den venstre hemisfære av hjernen. Kun 16 % av rottene hadde skader i den høyre hemisfæren. De nevronale skadene var ikke relatert til hvorvidt rottene hadde hatt konvulsjoner eller ikke. Ingen statistisk signifikante effekter av den medisinske behandlingen mellom de enkelte gruppene ble funnet ($P > 0.05$). Det ble derimot funnet forskjeller innenfor den gruppen av dyr som fikk skopolamin, HI-6, fysostigmin regimet. To-sidig U-test viste at skåringstallene for nevropatologi var signifikant høyere i venstre amygdala sammenlignet med høyre hemisfære når dosen av soman var 3 LD₅₀ ($P < 0.05$). Da somandosen var 4 LD₅₀ var patologiskåringen signifikant høyere i venstre piriform cortex enn på den høyre siden ($P < 0.05$). I gruppen av rotter som ble forbehandlet med pyridostigmin og behandlet med atropin, HI-6, avizafon regimet etter eksponering for 3 LD₅₀ soman (Tabell 5.4), ble et tilsvarende mønster med nevropatologi funnet. Alle rottene hadde varierende grad av patologi i piriform cortex og i amygdala 7 dager etter eksponering for soman. I kun 17 % av dyrene oppsto det nevronale skader i høyre hemisfære.

Behandling 1 og 5 min etter soman	N	2 LD ₅₀ soman				N	3 LD ₅₀ soman				N	4 LD ₅₀ soman			
		Piriform cortex		Amygdala			Piriform cortex		Amygdala			Piriform cortex		Amygdala	
		V	H	V	H		V	H	V	H		V	H	V	H
Atropin (100 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Avizafon (15 mg/kg)	8	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	0.0 (0-4)	0.0 (0-4)	5	0.0 (0-4)	0.0 (0-0)	0.0 (0-2)	0.0 (0-0)	0	---	---	---	---
Skopolamin(1 mg/kg) HI-6 (125 mg/kg) Fysostigmin (0.1 mg/kg)	8	1.5 (0-4)	0.0 (0-4)	0.5 (0-3)	0.0 (0-3)	8	0.5 (0-4)	0.0 (0-0)	1.5* (0-4)	0.0 (0-0)	7	1.5* (0-4)	0.0 (0-0)	0.0 (0-2)	0.0 (0-0)

Tabell 5.8 Nevropatologipoeng for rotter som overlevde i 7 dager etter eksponering til forskjellige konsentrasjoner av soman ble utført i hht retningslinjer fra McDonough et al (1995). Rottene ble behandlet med to typer av autoinjektorer. Nevropatologi ble registrert i høyre (H) og venstre (V) piriform cortex og i amygdala. Signifikant forskjell fra høyre side; *P<0.05.

6 Diskusjon

Resultatene fra denne studien viste at det var tilstrekkelig å administrere hvert behandlingsregime 2 ganger hos alle dyr for å hindre eller for å terminere epileptiform aktivitet. Det regimet som inneholdt skopolamin, HI-6, fysostigmin viste seg å være mest effektivt i å redde liv uavhengig av somandose. Atropin, HI-6, avizafon regimet var det mest effektive for de lavere dosene av soman. Atropin, toksogonin, diazepam regimet ga derimot liten beskyttelse og reddet livet til dyrene i kun begrenset grad. I de forsøkene hvor pyridostigmin ble gitt som profylakse økte overlevelsen etter behandling med atropin, HI-6, avizafon regimet, men ingen forbedring i beskyttelse ble observert for atropin, toksogonin, diazepam regimet. Selv om det siste regimet ble administrert 3 ganger uten profylakse ble ikke beskyttelsen forbedret og behandlingen var derfor utilstrekkelig. Hos rottene som ble behandlet med skopolamin, HI-6, fysostigmin regimet var kolinesterase-aktivitetsnivåene i erythrocytter (AChE) og i plasma (ChE) signifikant høyere enn i gruppen som fikk atropin, toksogonin, diazepam. ChE aktiviteten i hjernehomogenatene var høyere ved bruk av skopolamin, HI-6, fysostigmin regimet enn i gruppen av dyr som ble behandlet med atropin, HI-6, avizafon.

Den overlegne effekten til skopolamin, HI-6, fysostigmin regimet skyldes trolig fysostigminets evne til å beskytte en andel av AChE-aktiviteten i alle kroppens organer inkludert hjernen før den andelen av enzymet som ikke var fysostigminhemmet ble hemmet fullstendig av nervegassen soman, siden administreringen av fysostigmin skjer umiddelbart (1 min) etter soman. Det er vist at fysostigmin har en halveringstid ($T_{1/2}$) i plasma på 17 min og i hjernen på 16 min hos rotter (Somani og Khalique, 1986). Dette kan forklare hvorfor rotter som er behandlet med skopolamin, HI-6, fysostigmin regimet fritt kunne bevege seg omkring kun 10-30 min etter somanforgiftning. Fysostigminhemmet AChE vil spontanreaktiveres forholdsvis raskt og dermed bli et fysiologisk aktivt enzym slik at ACh igjen kan hydrolyseres. Denne prosessen er sannsynligvis også grunnen

til at de rottene som fikk fysostigmin sammen med skopolamin og HI-6 så raskt gjenopprettet en normal kroppsvekt uavhengig av somandose. Dessuten er legemiddelet skopolamin rapportert å være 170 ganger mer potent enn atropin i rotter (Capacio og Shih, 1991), som antagelig skyldes at skopolamin raskere passerer over blod-hjerne barrieren enn atropin. Tilsvarende er det vist at marsvin som har fått injisert toksogonin og fysostigmin 1 min etter en konvulsiv dose av soman har en overlevelse på 100 % (Joosen et al., 2011). I denne FFI-studien er det derimot vanskelig å anslå den relative betydningen av skopolamin og atropin.

HI-6 øker overlevelse hos rotter eksponert for soman når resultatene for bruk av atropin, HI-6, avizafon sammenlignes med resultatene etter bruk av atropin, toksogonin, diazepam regimet. I begge regimene er atropindosene identiske og dosen av diazepam (0.7 $\mu\text{mol/kg}$) og avizafon (vannløselig diazepam) (1.0 $\mu\text{mol/kg}$) ble justert slik at plasmakonsentrasjonene av disse to benzodiazepinene skulle bli tilnærmet like mht diazepam dose (Lallement et al., 2000). Det er vist at HI-6 beskytter respirasjonssenteret i hjernen og forbedrer nevrotransmisjonen i perifere vev som diafragma under nervegassforgiftning (van Helden et al., 1996). Dette er effekter som ikke skyldes reaktivering av AChE-aktiviteten, men antakelig er gunstige farmakologiske effekter på andre celler enn de kolinerge nervecellene i disse organene. Det er mulig at dette skyldes en påvirkning på ionotrope reseptorer eller ionekanaler som for eksempel en aktivering av GABAerge mekanismer i hjernen i tillegg til å kunne normalisere den nevro-muskulære transmisjon i diafragma (van Helden et al., 1996; Øydvin et al., 2005). Utfordringen ved bruk av de fleste oksimer er at disse legemidlene kun i begrenset grad passerer over blod-hjerne barrieren siden dette er kvarternære ladede molekyler. I somanforgiftede rotter er det vist ved bruk av mikrodialyseteknikk at HI-6 passerer over blod hjerne barrieren og nivået i hjernen er omlag 9 % av nivået i plasma mot 18 % under kontrollbetingelser (Cassel et al., 1997). Denne forskjellen kan skyldes nervegasspåvirkning på blodkar og dermed en effekt på sirkulasjon, men denne påvirkningen på blodsirkulasjon til hjernen er omdiskutert (Maxwell et al. 1987; Goldman et al., 1993; Cassel et al., 1997). De maksimale nivåene av HI-6 i hjernen er likevel kun omlag 10 % av nivåene i plasma målt i hjernen med denne teknikken (Cassel et al., 1997). HI-6 har dessuten vist, i motsetning til toksogonin og de fleste andre oksimer å ha en svært lav giftighet både i en rekke dyreeksperimentelle studier og i flere kliniske forsøk på mennesker som er blitt forgiftet av organofosfater (Clement, 1981; Lundy et al., 2011). Andre har blant annet vist at HI-6 kan reaktivere AChE i flere av organene hos rotter samt å redusere endringer i plasma kortikosteron og leverenzymet tyrosin aminotransferase som følge av somanforgiftning (Kassa, 1995). Det foreligger svært mye informasjon fra både dyreeksperimentelle og kliniske studier som viser at HI-6 både er et effektivt og lite giftig oksim (for oversikt se Lundy et al., 2011).

Funnet i denne studien, som viser en begrenset beskyttende virkning av atropin, toksogonin, diazepam mot nervegassen soman, er i overensstemmelse med tidligere resultater i ulike dyrearter (Hamilton og Lundy, 1989; Dawson, 1994; Kassa, 2002). Et enkeltstudium på rotter viser at toksogonin også kan motvirke den gunstige beskyttende virkningen av atropin og derved ha liten effekt mot nevrotoksiske symptomer og skadeutvikling i hjernen etter soman (Kassa og Koupilova, 2000). I publiserte arbeider på aper er det vist at atropin i kombinasjon med HI-6 beskytter mot 5 LD₅₀ doser av soman eller tabun, mens ingen dyr overlevde da atropin ble gitt

sammen med toksogonin (Hamilton og Lundy, 1989; Lundy et al., 2006). I dette arbeidet ble det ikke administrert benzodiazepiner som for eksempel diazepam. På den annen side er det generell internasjonal enighet etter gjennomføring av en rekke dyrestudier at toksogonin er et forholdsvis effektivt oksim mot nevegassen tabun og en rekke organofosfat insektmidler, og at toksogonin til en viss grad kan reaktivere tabun-hemmet AChE (Hamilton og Lundy, 1989; 2007; Dawson, 1994; Aas, 2000a; Kassa, 2002; Kassa og Krejeova, 2003; Worek et al., 1998; 2007). Det foreligger pr dato derfor intet bredspektert oksim som kan reaktivere og beskytte mot alle typer nervegasser og insektmidler (Aas, 2000a; 2003a). Derfor bør det i fremtidige dyreforsøk vurderes om også studier av kombinasjoner av forskjellige oksimer skal gjennomføres hvis kun ett motmiddelregime og ikke flere skal etableres mot nervegasser (Clement et al., 1987; Worek et al., 2007). Toksogonin og HI-6 kan i så fall være en kombinasjon av oksimer som bør vurderes for utprøving på dyr mot flere nervegasser.

Det er et solid vitenskapelig belegg for at profylakse med pyridostigmin og bruk av autoinjektorer som inneholder atropin og et oksim i akuttbehandling etter nervegasseksponering øker overlevelse hos forsøksdyr utsatt for flere dødelige doser av alle typer nervegass (Dirnhuber et al., 1979; Inns og Leadbeater, 1983). Pyridostigmin administrert alene uten oppfølgende terapi kan også redusere dødeligheten ved nervegassforgiftning hos rotter eksponert for 1.3 LD₅₀ av soman (Myhrer et al., 2011). I den foreliggende studien ble det vist at forbehandling med pyridostigmin hadde en gunstig effekt ved akuttbehandling med atropin, HI-6, avizafon, men ikke ved bruk av atropin, toksogonin, diazepam regimet. Fraværet av en positiv virkning ved bruk av atropin, toksogonin, diazepam skyldes mest sannsynlig at toksogonin ikke er spesielt effektivt i å reaktivere AChE enzymet etter eksponering for soman. Antakelig ville en høyere overlevelse blitt resultatet hvis pyridostigminprofylakse hadde vært gitt før soman eksponering til 4 LD₅₀ doser av soman og deretter bruk av atropin, HI-6, avizafon. Alternativt kunne langt høyere dose av HI-6 vært benyttet siden giftigheten av HI-6 er betydelig lavere enn for toksogonin og andre oksimer (Clement, 1983; Lundy et al., 2011). Samlet viser denne studien derfor at atropin, HI-6, avizafon regimet har en bedre virkning mot forgiftning med nervegassen soman enn hva som er tilfelle for atropin, toksogonin, diazepam regimet.

I denne studien viste skopolamin, HI-6, fysostigmin regimet å gi en svært god beskyttende effekt mot soman når administrasjon av legemidlene startet 1 min etter nervegass. En slik beskyttende effekt mot økt dødelighet og mot inkapasitering er tidligere også vist i andre dyrearter som marsvin ved forgiftning med flere forskjellige nervegasser (Wetherell et al., 2006). I praksis vil militært personell først starte administrasjon av legemidler etter at de første symptomer på nervegassforgiftning opptrer. Ved dette tidspunkt har nervegass allerede kommet inn i blodbanen og hemmet AChE aktiviteten i blod, hjerne, luftveier og lunger, diafragma og i andre viktige organer. I forsøk på dyr hvor fysostigmin og toksogonin er blitt gitt til marsvin 10 min etter en konvulsiv dose med soman er overlevelse kun 33 % sammenlignet med 100 % når den samme kombinasjonen av legemidler ble gitt 1 min etter somaneksponering (Joosen et al., 2011). Dessuten var dosen av fysostigmin avgjørende, siden karbamylering av AChE med fysostigmin er for lav til å gi tilstrekkelig beskyttelse ved lave doser av fysostigmin, men for høy ved høye doser av fysostigmin slik at karbamyleringsraten av AChE blir høyere enn dekarbamyleringsraten

(Joosen et al., 2011). En midlere dose av fysostigmin i dyreforsøkene viste å gi adekvat beskyttelse ved administrering 1 min etter soman. Resultatene viste klart at en sen administrasjon (noen minutter) av fysostigmin etter nervegass kan ha svært uheldige virkninger ved bruk av denne legemiddelkombinasjonen og kan redusere overlevelse etter soman (Joosen et al., 2011). Sen administrasjon av fysostigmin vil også øke AChE hemmingen i blod, hjerne og andre vitale organer og derved øke forgiftningen etter nervegass. Derfor kan det bli stilt spørsmål ved virkning og beskyttelse ved bruk av skopolamin, HI-6, fysostigmin regimet som et alternativ som autoinjektor terapi, siden dette regimet har et svært begrenset tidsvindu for denne type bruk.

Nevropatologi etter eksponering for nervegass er vanligvis assosiert med epileptiforme anfall som varer mer enn 20 min etter start (Lallement et al., 1994; McDonough et al., 1995). Siden slike anfall var fraværende eller varte kun i begrenset tid fra 1 til 6 min hos noen rotter i denne studien, var derimot funnene av morfologiske endringer overraskende. Det ble ikke funnet noe samsvar mellom nevropatologi og tilstedeværelsen av anfall/ikke-anfall. Fluorescerende farging av celler i hjernesnitt som et uttrykk for skade ble oftere observert hos rotter som hadde fått skopolamin, HI-6, fysostigmin regimet enn hos de rotter som hadde fått atropin, HI-6, avizafon regimet. Siden dette siste regimet inneholder avizafon, kan dette være årsaken til at dette legemiddelregimet bidrar til en bedre beskyttelse av nervecellene i hjernen, til tross for at avizafon tidligere er vist å kunne gi en noe lavere beskyttelse av nerveceller enn hva som er vist for diazepam (Clement og Broxup, 1993). En tilsvarende god beskyttelse mot somanforgiftning er tidligere vist hos aper som er gitt atropin og HI-6 sammen med avizafon, hvor raskere restitusjon og mindre utbredelse av hjerneskode ble vist i forhold til ved bruk av atropin, pralidoksim, diazepam (Lallement et al., 1997). Et interessant funn var imidlertid at nevropatologi nesten alltid oppstod i venstre hemisfære. Den venstre frontale/piriforme cortex hos rotter i den rottestammen som er studert i dette arbeidet har høyere konsentrasjon av neurotransmitteren glutamat enn i den høyre hemisfæren (Myhrer et al., 1992). De nevropatologiske endringene som ble observert i venstre piriforme cortex og amygdala i rottene som overlevde 7 dager kan relateres til glutamaterg overstimulering etter forgiftning med relativt høye doser av soman (2-4 LD₅₀). Det er tidligere vist i studier av hippokampuskiver i kultur at eksponering til lave doser soman i 7 dager fører til at hjernevevet blir følsomt for korte perioder med overstimulering av en type av glutamatreseptorer med agonisten AMPA som normalt resulterer i lite eller ingen eksitotoksiske skader (Munirathinam og Bahr, 2004). Den tilsynelatende unilateralt induerte nevronale skaden antyder at lokale eksitotoksiske prosesser urelatert til globalt utløste anfall kan indueres av nervegasser. Dette understøttes av at det i to tidligere studier er vist at det oppstår nevropatologi etter somanforgiftning hos dyr uten åpenbare forgiftningssymptomer (Hymowitz et al., 1990; Kadar et al., 1992). Samlet tyder disse funnene på at asymptomatisk utvikling av nevronale skader etter nervegass bør følges opp med ytterligere medisinsk behandling etter avslutning av epileptiform aktivitet, siden en upåaktet skadeutvikling i hjernen kan være igangsatt av nervegass. For en slik behandling mot hjerneskode og oppfølgende senbehandling kan glutamaterge antagonister anvendes. Dette bør følges opp i nye studier.

7 Konklusjon

Av de tre autoinjektorregimene som er undersøkt i denne studien på rotte har skopolamin, HI-6, fysostigmin regimet den beste virkningen mot soman. På grunn av det svært korte tidsvinduet for bruk som dette regimet har er dette antakelig uegnet for praktisk bruk i Forsvaret eller på et skadested hvor sivile er involvert. Dessuten er dosen av fysostigmin kritisk for hvorvidt dette legemiddelet vil øke eller redusere overlevelse. Atropin, HI-6, avizafon regimet er langt mer effektivt enn atropin, toksogonin, diazepam regimet, som er i bruk i Norge i dag, og vil kunne utgjøre en mer effektivt fremtidig terapi ved somanforgiftning enn det det nåværende motmiddelregimet gir forutsatt at pyridostigmin profylakse er administrert. Atropin, HI-6, avizafon regimet kan gis noe senere etter somanforgiftning enn skopolamin, HI-6, fysostigmin regimet uten at effekten av regimet forsvinner. Selv om ingen tydelige tegn på nervegassforgiftning er til stede etter en forgiftning kan glutamaterg eksitotoksisk aktivitet i hjernen oppstå lokalt etter relativt høye doser av soman. På bakgrunn av resultatene fra forskningsarbeidene i flere NATO-land vurderer flere av disse landene å innføre autoinjektorer inneholdende en kombinasjon av atropin, HI-6 (DMS saltet) og et benzodiazepin (diazepam, avizafon eller midazolam). Denne studien vil derfor være et viktig norsk bidrag i den pågående diskusjonen blant flere NATO-land om fremtidig akutt medisinsk behandling av nervegassforgiftning. Konklusjonen støtter opp under den anbefalingen FFI ga Forsvarets sanitet i år 2000 (Aas, 2000a). En videre oppfølgende medisinsk behandling etter bruk av profylakse og autoinjektorer i Forsvaret og ved sivile hendelser må vurderes for å unngå utvikling av senskader i for eksempel hjernen. Det vil være en fordel å kunne administrere legemidler og få en god terapeutisk effekt også ved forsinket førstegangsadministrasjon etter nervegass. Her kan medikamenter som for eksempel procyclidin og levetiracetam vurderes for nærmere undersøkelser sammen med klassiske motmidler som oksimer, siden medikamentene har vist å virke beskyttende mot soman i dyrestudier ved FFI.

Referanser

- Aas, P., Håndteringen av en avtalebryter. UNSCOMs og IAEAs nedrustning av Iraks masseødeleggelsesvåpen. Internasjonal Politikk 1997; 1: 41-60.
- Aas, P., Biologiske og kjemiske våpen – Hva er trusselen? Militær Teknikk 1999; 2-3: 46-52.
- Aas, P., 2000a, Autoinjektorer mot nervegassforgiftning for Forsvaret fra år 2000 – Anbefalinger fra FFI. FFI-rapport 2000/00020 (Begrenset).
- Aas, P., 2000b, Rapport fra møtet ”Nye autoinjektorer”, Bonn, Tyskland, 10-11 oktober 2000. FFI-reiserapport-2000/05951 (Begrenset).
- Aas, P., Biologiske og kjemiske våpen – hvor farlige er de? NRK P2 Akademiet 2002; 137-49.
- Aas, P., 2003a, Future considerations for the medical management of nerve agent intoxication, Prehospital and Disaster Medicine, 18, 3, 208-216.
- Aas, P., 2003b, The threat of mid-spectrum chemical warfare agents. Prehospital and Disaster Medicine, 18, 4, 306-312.
- Aas, P., 2006, Medisiner mot nervegass. FFI-Fokus, 3-06.
- Aas, P., Jacobsen, D., 2005, Nervegass - Retningslinjer ved terror. Tidsskriftet for Den norske Lægeförening, 6, 125, 23-27.
- Aas, P., Myhrer, T., 2003, Aktuelle motmidler mot hjernesker ved nervegasseksponering. FFI-rapport 2003/01278.
- Aas, P., Myhrer, T., Heyerdahl, F., 2009, Legemidler I supplerende medisinsk behandling ved nervegassforgiftning – aktuelle legemidler I beskyttelse av hjernen. FFI-rapport 2009/01858.
- Abraham, R.B., Rudick, V., Weinbroum, A.A., 2002, Practical guidelines for acute care of victims of bioterrorism: Conventional injuries and concomitant nerve agent intoxication. Anesthesiology, 97, 989-1004.
- Bajgar, J., 2009, Development of antidotes against nerve agents in the Czech Republic. The ASA Newsletter, 09-6, 1,7-9.
- Bajgar, J., Fusek, J., Kassa, J., Kuca, K., Jun, D., 2009, Chemical aspects of pharmacological prophylaxis against nerve agent poisoning. Curr. Medicinal. Chem., 16, 2977-2986.

- Capacio, B.R., Shih, T.M., 1991, Anticonvulsant actions of anticholinergic drugs in soman poisoning. *Epilepsia*, 32, 5, 604-615.
- Carpentier, P., Lambrinidis, M., Blanchet, G., 1991, Early dendritic changes in hippocampal pyramidal neurones (field CA1) of rats subjected to acute soman intoxication: a light microscopic study. *Brain Res.*, 541, 293-299.
- Cassel, G.E., Fosbraey, P., 1996, Measurement of the oxime HI-6 after peripheral administration in tandem with neurotransmitter levels in striatal dialysates: Effects of soman intoxication. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 35, 159-166.
- Cassel, G., Karlsson, L., Waara, L., Ang, K.W., Göransson-Nyberg, A., 1997, Pharmacokinetics and effects of HI 6 in blood and brain of soman- intoxicated rats: A microinfusion study. *Eur. J. Pharmacol.*, 332, 43-52.
- Clement, J., 1981, Toxicology and pharmacology of bispyridinium oximes – insight into the mechanism of action vs soman poisoning in vivo. *Fund. Appl. Toxicol.*, 1, 193-202.
- Clement, J.G., 1983, Efficacy of mono- and bis-pyridinium oximes versus soman, sarin and tabun poisoning in mice. *Fund. Appl. Toxicol.* 3, 533-535.
- Clement, J.G., Shiloff, J.D., Gennings, C., 1987, Efficacy of a combination of acetylcholinesterase reactivators, HI-6 and obidoxime, against tabun and soman poisoning of mice. *Arch. Toxicol.* 61, 70-75.
- Clement, J.G., Broxup, B., 1993, Efficacy of diazepam and avizafon against soman-induced neuropathology in brain of rats. *Neurotoxicol.* 14, 4, 485-504.
- Counter biological and Chemical Terrorism. WP5000: Protective equipment. FFI-rapport 2009/00493 (unntatt offentlighet).
- Dawson, R.M., 1994, Review of oximes available for treatment of nerve agents poisoning. *J. Appl. Toxicol.* 14, 5, 317-331.
- Dirnhuber, P., French, M.C., Green, D.M., Leadbeater, L., Stratton, J.A., 1979, The protection of primates against soman poisoning by pretreatment with pyridostigmine. *J. Pharm. Pharmacol.* 31, 295-299.
- Goldmann, H., Bergman, R.F., Hazlett, J., Murphy, S., 1993, Cerebrovascular responses to soman: Time and dose dependent effects. *Neurotoxicol.* 14, 469-483.
- Hamilton, M.G., Lundy, P.M., 1989, HI-6 therapy of soman and tabun poisoning in primates and rodents. *Arch. Toxicol.* 63, 144-149.

- Hamilton, M.G., Lundy, P.M., 2007, Medical countermeasures to WMDs: Defence research for civilian and military use. *Toxicol.* 233, 8-12.
- Hilmas, C.J., Smart, J.K., Hill, B.A. jr., 2008, History of chemical warfare. *Textbook of Military Medicine: Medical aspects of chemical warfare*, s. 9-76 (Ed: M.K. Lenhart).
- Hymowitz, N., Ploshnick, A., Laemle, L., Brezenoff, H., 1990, Effects of repeated administration of soman on scheduled-controlled behavior and brain in the rat. *Neurotoxicol. Terratol.*, 12, 47-56.
- Inns, R.H., Leadbeater, L., 1983, The efficacy of bispyridinium derivatives in the treatment of organophosphate poisoning in the guinea-pig. *J. Pharm. Pharmacol.* 35, 427-433.
- Joosen, M.J.A., Smit, A.B., van Helden, H.P.M., 2011, Treatment efficacy in soman-poisoned guinea pig model: added value of physostigmine? *Arch. Toxicol.*, 85, 227-237.
- Kadar, T., Cohen, G., Sahar, R., Alkalai, D., Shapira, S., 1992, Long-term study of brain lesions following soman, in comparison to DFP and metrazol poisoning. *Human Exp. Toxicol.* 11, 517-523.
- Kassa, J., 1995, Comparison of efficacy of two oximes (HI-6 og obidoxime) in soman poisoning in rats. *Toxicology* 101, 167-174.
- Kassa, J., 2002, Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *Clin. Toxicol.* 40, 6, 803-816.
- Kassa, J., Koupilová, M., 2000, Neuroprotective effects of currently used antidotes in soman-poisoned rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 67, 663-668.
- Kassa, J., Krejčová, G., 2003. Neuroprotective effects of currently used antidotes in tabun-poisoned rats. *Pharmacol. Toxicol.*, 92, 258-264.
- Krummer, S., Thiermann, H., Worek, F., Eyer, P., 2002, Equipotent cholinesterase reactivation in vitro by the nerve agent antidotes HI-6 dichloride and HI-6 dimethanesulfonate. *Arch. Toxicol.*, 76, 10, 589-595.
- Kusic, R., Boskovic, B., Vojvodic, V., Janovic, D., 1985, HI-6 in man: Blood levels, urinary excretion, and tolerance after intramuscular administration of the oxime to healthy volunteers. *Fund. Appl. Toxicol.*, 5, S89-S97.

- Lallement, G., Denoyer, M., Collet, A., Pernot-Marino, I., Baubichon, D., Monmaur, et al., 1992, Changes in hippocampal acetylcholine and glutamate extracellular levels during soman-induced seizures: influence of septal cholinergic cells. *Neurosci. Lett.*, 139, 104-107.
- Lallement, G., Pernot-Marino, I., Baubichon, D., Burckhart, M-F., Carpentier P., Blanchet, G., 1994, Modulation of soman-induced neuropathology with an anticonvulsant regimen. *Neuroreport*, 5, 2265-2268.
- Lallement, G., Clarencon, D., Brochier, G., Baubichon, D., Galonnier, M., Blanchet, G., Mestries, J.C., 1997, Efficacy of atropine/pralidoxime/diazepam or atropine/HI-6/prodiazepam in primates intoxicated by soman. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56, 2, 325-332.
- Lallement, G., Dorandeu, Filliat, P., Carpentier, P., Baille, V., Blanchet, G., 1998, Medical management of organophosphate-induced seizures. *J. Physiol. (Paris)*, 92, 369-373.
- Lallement, G., Renault, F., Baubichon, D., Peoc'h, M., Burckhart, M.-F., Galonnier, M., Clarencon, D., Jourdil, N., 2000, Compared efficacy of diazepam or avizafone to prevent soman-induced electroencephalographic disturbances and neuropathology in primates: Relationship to plasmatic benzodiazepine pharmacokinetics. *Arch. Toxicol.*, 74, 480-486.
- Ligtenstein, D.A., Kossen, S.P., 1983, Kinetic profile in blood and brain of the cholinesterase reactivity oxime HI-6 after intravenous administration to the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71, 177-183.
- Lorke, D.E., Hasan, M.Y., Nurulain, S.M., Sheen, R., Kuča, K., Petroianu, G.A., 2007, Entry of two new asymmetric bispyridinium oximes (K-27 and K-48) into the rat brain: comparison with obidoxime. *J. Appl. Toxicol.*, 27, 482-490.
- Lundy, P.M., Raveh, L., Amitai, G., 2006, Development of the bisquaternary oxime HI-6 toward clinical use in the treatment of organophosphate nerve agent poisoning. *Toxicol. Rev.*, 25, 231-243.
- Lundy, P., Hamilton, M.G., Sawyer, T.W., Mikler, J., 2011, Comparative protective effects of HI-6 and MMB-4 against organophosphorous nerve agent poisoning. *Toxicol.* 285, 3, 90-96.
- Maxwell, D.M., Lenz, D.E., Groff, W.A., Kaminskis, A., Froelich, H.L., 1987, The effects of blood flow and detoxification on in vivo cholinesterase inhibition by soman in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 88, 66-76.
- McDonough Jr., J.H., Shih, T.-M., 1993, Pharmacological modulation of soman-induced seizures. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 17, 203-215.
- McDonough Jr., J.H., Dochterman, W., Smith, S.D., Shih, T.-M., 1995, Protection against nerve agent-induced neuropathology, but not cardiac pathology, is associated with the anticonvulsant action of drug treatment. *Neurotoxicol.*, 15, 123-132.

McDonough, J.H., Shih, T.-M., 1997, Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci. Biobehavioural Rev.*, 21, 5, 559-579.

McDonough, J.H., McMonagle, J., Copeland, T.L., Zoëffel, L.D., Shih, T.-M., 1999, Comparative evaluation of benzodiazepines for control of soman-induced seizures. *Arch. Toxicol.*, 73, 473-478.

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

Munirathinam, S., Bahr, B.A., 2004, Repeated contact with subtoxic soman leads to synaptic vulnerability in hippocampus. *J. Neurosci., Res.* 77, 739-746.

Myhrer, T., Utsikt, L., Fjelland, J., Iversen, E.G., Fonnum, F., 1992, Differential rearing conditions in rats: Effects on neurochemistry and cognitive behaviors. *Brain Res. Bull.*, 28, 427-434.

Myhrer, T., Nguyen, N.H.T., Andersen, J.M., Aas, P., 2004, Protection against soman-induced seizures: relationship among doses of prophylactics, soman, and adjuncts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 196, 327-336.

Myhrer, T., Enger, S., Jonassen, M., Aas, P., 2011, Enhanced efficacy of anticonvulsants when combined with levetiracetam in soman-exposed rats. *Neurotoxicol.*, 32, 923-930.

Newmark, J., 2004, Therapy of nerve agent poisoning. *Arch. Neurol.*, 61, 649-652.

Newmark, J., 2005, Nerve agents. *Neurol. Clin.* 623-641.

Newmark, J., 2007, Nerve agents. *The Neurologist*, 13, 1, 20-32.

Okumura, T., Takasu, N., Ishimatsu, S., Miyanoki, S., Mitsuhashi, A., Kumada, K., Tanaka, K., Hinohara, S., 1996, Report on 640 victims of the Tokyo subway sarin attack. *Ann. Emerg. Med.*, 28, 129-135.

Pearson, G.S. 1999, *The UNSCOM Saga. Chemical and Biological Weapons Non-Proliferation.* Editor: J. Whitman. McMillan Press Ltd.

Pearson, G.S., Magee, R.S., 2002, Critical evaluation of proven chemical weapon destruction technologies (IUPAC Technical Report). *IUPAC, Pure and Appl. Chem.* 74, 187-316.

Otomi, S., Takase, M., Kumagai, F., 1996, Sarin Poisoning in Japan. A clinical Experience in Japan Self Defence Force (JSDF) Central Hospital. *Int Review of the Armed Forces Medical Services*; Vol. LXIX (suppl 4/5/6): 97-102.

Rousseaux, C.G., Dua, A.K., 1989, Pharmacology of HI-6, an H-series oxime. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 1183-1189.

Schmued, L.C., Hopkins, K.J., 2000, Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874, 123-130.

Schmued, L. C., Albertson, C., Slikker Jr, W., 1997, Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 751, 37-46.

Sidell, F.R., Newmark, J., McDonough, J.H., 2008, Nerve agents. *Textbook of Military Medicine: Medical aspects of chemical warfare*, s. 155-220 (Ed: M.K. Lenhart).

Somani, S. M., Khaliq, A., 1986, Distribution and pharmacokinetics of physostigmine in rat after intramuscular administration. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 6, 327-334.

Sterri, S. H., Lyngaas, S., Fonnum, F., 1980, Toxicity of soman after repetitive injection of sublethal doses in rat. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 46, 1-7.

Thiermann, H., Seidl, S., Eyer P., 1996, HI-6 dimethanesulfonate has better dissolution properties than HI-6 dichloride for application in dry/wet autoinjectors. *Int. J. Pharmaceut.*, 137, 167-176.

Tattersall, J.E., 1993, Ion blockade by oximes and recovery of diaphragm muscle from soman poisoning in vitro. 108, 1006-1015.

Todrik, A., 1954, The inhibition of cholinesterases by antagonists of acetylcholine and histamine. *Br. J. Pharmacol.*, 9, 76-83.

United Nations Security Council, 1984, Report of the specialists appointed by the Secretary-General to investigate allegations by the Islamic republic of Iran concerning the use of chemical weapons. S/16433.

United Nations Security Council, 1986, Report of the mission dispatched by the UN Secretary-General to Investigate Allegations of the use of chemical weapons in the conflict between the Islamic republic of Iran and Iraq. S/17911.

United Nations Security Council, 1988, Report of the mission dispatched by the Secretary-General to investigate allegations of the use of chemical weapons in the conflict between the Islamic republic of Iran and Iraq. S/19823.

van Helden, H. P., van der Wiel, H.J., de Lang, J., Busker, R.W., Melchers, B.P., Wolthuis, O.L., 1992, Therapeutic efficacy of HI-6 in soman- poisoned marmoset monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115, 50-56

van Helden, H.P.M., Busker, R.W., Melchers, B.P.C., Bruijnzeel, P.L.B., 1996, Pharmacological effects of oximes: how relevant are they? *Arch. Toxicol.*, 70, 779-786.

Waters L., Chemical weapons in the Iran/Iraq War, 1990, *Military Review*, 70: 57-63.

Wetherell, J., Hall, T., Passingham, S., 2002, Physostigmine and hyoscine improves protection against the lethal and incapacitating effects of nerve agent poisoning in the guinea-pig. *Neurotoxicol.*, 23, 341-249.

Wetherell, J., Price, M., Mumford, H., 2006, A novel approach for medical countermeasures to nerve agent poisoning in the guinea-pig. *Neurotoxicol.* 27, 485-491.

Wetherell, J., Price, M., Mumford, H., Armstrong, S., Scott, L., 2007, Development of next generation medical countermeasures to nerve agent poisoning. *Toxicol.*, 233, 120- 127.

Worek, F., Kirchner, T., Szinicz, L., 1994, Treatment of tabun poisoned guinea-pigs with atropine, HI-6 or HI-6: effect on respiratory and circulatory function. *Arch. Toxicol.* 68, 231-239.

Worek, F., Widmann, R., Knopff, O., Szinicz, L., 1998, Reactivating potency of obidoxime, pralidoxime, HI-6 and HI-6 in human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by highly toxic organophosphorus compounds. *Arch. Toxicol.* 72, 237-243.

Worek, F., Aurbek, N., Thiermann, H., 2007, Reactivation of organophosphate-inhibited human AChE by combinations of obidoxime and HI-6 in vitro. *Appl. Toxicol.*, 27, 582-588.

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, 231-237.

www.opcw.org. Kjemivåpenkonvensjonen (1. desember 2011)

Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R.P., 1997, A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Application in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochem.*, 253, 162-168.

Øydvin, O.K., Tansø, R., Aas, P., 2005, Effects of oximes on acetylcholine release in rat hippocampal slices during soman intoxication. Eur. J. Pharmacol., 516, 227-234.

Forkortelser

ACh	- Acetylcholin (nevrottransmitter i nervesystemet)
AChE	- Acetylcholinesterase
AMPA	- α -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionic Acid
ChE	- Pseudokolinesterase
CD&E	- Concept, Development & Experimentation
DAPI	- 4,6-diamidino-2-fenylindol dihydroklorid (fargestoff for nerveceller)
DMS	- Dimetansulfonat (salt)
Dstl	- Defence science and technology laboratory (Storbritannia)
EEG	- Elektroencefalografi
FFI	- Forsvarets forskningsinstitutt
HI-6	- 4-aminocarbonyl-pyridino-methoxy-methyl-2-hydroxyimino-methyl-pyridinium-diklorid
I.P.	- Intraperitonealt (i bukhulen)
I.M.	- Intramuskulært (i skjelettmuskulatur)
LD ₅₀	- Dødelig dose som tar livet av 50 % av en eksponert gruppe
LD ₁₀₀	- Dødelig dose som tar livet av 100 % av en eksponert gruppe
MMB-4	- Methoxim (1,1'-trimethylene bis(4-(hydroxyimino)methyl)pyridinium dibromide)
NATO	- North Atlantic Treaty Organisation
OPCW	- Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (Den Haag, Nederland)
2-PAM	- Pralidoksim methiodide salt
PANPAL	- Medisinsk motmiddelregime mot nervegasser i Den tsjekkiske republikk bestående av pyridostigmin, benactyzin og trihexyfenidyl
P2S	- Pralidoksim methansulfonat salt
S.C.	- Subcutan (under huden)
TRANSANT	- Medisinsk motmiddelregime mot nervegasser i Den tsjekkiske Republikk. Dette er beregnet for profylaktisk bruk og inneholder HI-6 i et plaster for hudabsorpsjon
VR	- Russisk VX (nervegass)