

**ON THE APPLICATION OF OBIDOXIME CHLORIDE  
(TOXOGONIN®) IN SARIN POISONING -  
A PHARMACOLOGICAL STUDY  
CARRIED OUT IN MICE AND RATS**

A dissertation  
submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE  
OF  
TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
CATHERINE MADELEINE STREICHENBERG  
dipl. nat. sc. S.F.I.T.  
born March 11th, 1960  
citizen of Basle, BS

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. P.G. Waser, examiner  
Prof. Dr. X. Perlia, co-examiner

## IX. SUMMARY

By means of whole-body autoradiography  $^{14}\text{C}$ -labeled obidoxime was localized in mice (controls), pregnant mice and sarin-poisoned (1.5mg/kg i.v.) mice.  $^{14}\text{C}$ -obidoxime was administered as single intravenous injection in a dose of 100mg/kg, which corresponds to the dosis letalis in mice. Distribution of  $^{14}\text{C}$ -obidoxime occurred early in the whole organism. Liver, kidneys, bladder, intestinal mucosa and organ structures containing cartilage were mostly involved. The continuous increase in the kidneys and the bladder showed that elimination occurred mainly by the renal route. Mice exposed to sarin, either before or after  $^{14}\text{C}$ -obidoxime administration, exhibited elevated  $^{14}\text{C}$ -obidoxime levels in the blood and the lungs, but smaller amounts, increasing with time, in the kidneys and the liver, compared with the control animals. A similar time progress of radioactivity was observed in pregnant mice. Thus, the obidoxime turnover was slowed down in sarin-poisoned mice and in pregnant mice which consequently resulted in a retardation of elimination. New important facts are: the CNS (brain and spinal cord) remained free from radioactivity in all the experiments performed. Furthermore, sarin did not influence the blood-brain barrier in terms of an easier penetration effect for  $^{14}\text{C}$ -obidoxime. Fetuses in pregnant mice received only very little radioactivity, as the placental barrier prevented it passing into the fetal blood.

The pharmacokinetic profile in plasma and, the biliary and urinary elimination of  $^{14}\text{C}$ -obidoxime (50mg/kg i.v.) were investigated in normal rats and sarin-poisoned (50 $\mu\text{g}$ /kg i.v.) rats. The kinetics were described by a two-compartment open model. The mean elimination half-life ranged from 35min in normal rats to 86min in sarin-poisoned rats.  $^{14}\text{C}$ -obidoxime elimination occurred predominantly by the renal route, while biliary excretion was negligible. The renal portion of total radioactivity elimination was 4.6% of the dose administered in normal rats and 0.9% in sarin-poisoned rats within the first hour of administration. The apparent retardation of elimination was confirmed by the diminished glomerular filtration rate in sarin-poisoned rats. Significant differences in pharmacokinetic behavior of  $^{14}\text{C}$ -obidoxime in sarin-poisoned rats were observed, especially concerning the elimination phase. It is suggested that sarin impairs the elimination of obidoxime.

The mean arterial blood pressure response to obidoxime, atropine and sarin was measured in normal rats and in sarin-poisoned (50µg/kg i.v.) rats. Obidoxime (50mg/kg i.v.) and atropine (5mg/kg i.v.), both induced a transient hypotension, but increased heart rate. Sarin induced a rise in blood pressure. The onset of the pressor response began within minutes of drug administration and lasted about 3 minutes. A transient bradycardia was observed; heart rate, however, returned to control levels well before normalization of the pressor response. In sarin-poisoned rats the therapeutic sequence of administration of obidoxime and atropine seemed to be important: the administration of atropine 10 minutes after and of obidoxime 20 minutes after sarin poisoning exerted a stabilizing effect on MAP. The prophylactic administration of obidoxime 20 minutes before sarin had no effect on the sarin-induced blood pressure/circulation effect.

No serum albumin binding was found for obidoxime. Competition experiments at the isolated nicotinic acetylcholine receptor revealed the cholinergic specificity of obidoxime. The affinity of obidoxime, however, was 1000 times smaller, as compared with ACh.

A direct interaction between sarin and obidoxime was shown *in vitro*. By different analytical methods there was evidence that both oxime groups of obidoxime were phosphorylated by sarin in aqueous solution at physiological pH. The decomposition of the mono-phosphorylated obidoxime, as measured by  $^{31}\text{P}$ -NMR, occurred fast, with  $t_{1/2} = 13.1\text{min}$ , whereas decomposition of di-phosphorylated obidoxime was even faster.

In conclusion, the main action of obidoxime in sarin poisoning occurred predominantly in the periphery, (i) interacting with free sarin molecules in order to have a detoxifying action and thereby restricting the distribution of sarin in the organism, and (ii) exerting pharmacological actions such as ganglion blocking effects and post-junctional "curare-like" effects.

## X. ZUSAMMENFASSUNG

Die Verteilung von  $^{14}\text{C}$ -Obidoxime in Mäusen, schwangeren Mäusen und in Sarin (1.5mg/kg i.v.) vergifteten Mäusen wurde anhand der Ganztierautoradiographie untersucht.  $^{14}\text{C}$ -Obidoxime wurde intravenös in einer der  $\text{LD}_{100}$  entsprechenden Dosis von 100mg/kg injiziert.  $^{14}\text{C}$ -Obidoxime verteilte sich schnell im ganzen Organismus. Insbesondere zeigte sich eine Anreicherung in den folgenden Organen: Leber, Niere, Blase, Darmschleimhaut und Skelettknorpel. Die stete Zunahme in der Niere und in der Blase deuteten darauf hin, dass  $^{14}\text{C}$ -Obidoxime vor allem über die Niere ausgeschieden wird. Schwangere wie auch mit Sarin vergiftete Mäuse - vor bzw. nach Verabreichung von  $^{14}\text{C}$ -Obidoxime - wiesen erhöhte Blut- und Lungenwerte auf, während in der Niere und in der Leber kleinere, aber mit der Zeit zunehmende Mengen nachgewiesen wurden. Sarin-Vergiftung und Schwangerschaft bewirken somit eine Verlangsamung des Obidoxime Turnovers und folglich eine verzögerte Ausscheidung. Als neue Erkenntnis wurde festgestellt, dass das zentrale Nervensystem (Hirn und Rückenmark) in allen durchgeführten Experimenten frei von Radioaktivität war. Sarin hat überdies keinen Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke, im Sinne einer Permeabilitätssteigerung für Obidoxime. Auch scheint die Placenta den Austausch von  $^{14}\text{C}$ -Obidoxime vom Mutterblut ins foetale Blut zu verhindern, da nur geringe Radioaktivität in den Foeten von schwangeren Mäusen nachgewiesen werden konnte.

Der zeitliche Verlauf des  $^{14}\text{C}$ -Obidoximespiegels im Plasma nach i.v. Injektion (50mg/kg) und dessen biliäre und renale Ausscheidung wurde in Ratten und in Sarin (50 $\mu\text{g}$ /kg i.v.) vergifteten Ratten untersucht. Die Kinetik verhielt sich gemäss einem offenen Zwei-Kompartiment-Modell. Die mittlere Eliminationshalbwertszeit variierte zwischen 35 Minuten in Ratten ohne Sarin-Behandlung und 86 Minuten in Sarin vergifteten Ratten.  $^{14}\text{C}$ -Obidoxime wurde vor allem über die Nieren ausgeschieden, während die biliäre Ausscheidung unbedeutend war. Die total ausgeschiedene Menge im Urin betrug während der ersten Stunde 4.6% der applizierten Dosis bei Ratten ohne Sarin-Behandlung und 0.9% bei Sarin vergifteten Ratten. Diese signifikante Verlangsamung des Eliminationsvorganges bei Sarin vergifteten Ratten fand seine Bestätigung in einer erniedrigten glomerulären Filtrationsrate. Weitere

signifikante Unterschiede im pharmakokinetischen Verhalten von  $^{14}\text{C}$ -Obidoxime in Sarin vergifteten Ratten betrafen vor allem die Eliminationsvorgänge. Es wird vermutet, dass Sarin eine Verlangsamung der Obidoxime-Ausscheidung bewirkt.

Die Veränderung des mittleren arteriellen Blutdruckes auf Obidoxime, Atropin und Sarin wurde in unbehandelten Ratten und in Sarin ( $50\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v.) vergifteten Ratten gemessen. Obidoxime ( $50\text{mg}/\text{kg}$  i.v.) und Atropin ( $5\text{mg}/\text{kg}$  i.v.) bewirkten eine vorübergehende Blutdrucksenkung, erhöhten aber die Herzfrequenz. Die i.v. Injektion von Sarin führte innerhalb von wenigen Minuten zu einer deutlichen Blutdrucksteigerung. Gleichzeitig stellte sich eine vorübergehende Bradykardie ein. Die pressorische Wirkung von Sarin hielt ungefähr 3 Minuten an. Danach sank der Blutdruck langsam ab, während die Herzfrequenz wieder Ausgangswerte erreicht hatte. Bei Sarin behandelten Tieren war die Reihenfolge der therapeutischen Applikation von Obidoxime und Atropin massgebend für die Stabilisierung des Blutdruckes. Die Verabreichung von Atropin 10 Minuten nach der Vergiftung mit Sarin und von Obidoxime nach weiteren 10 Minuten vermochte den Blutdruck auf Ausgangswerte zu normalisieren. Die prophylaktische Verabreichung von Obidoxime 20 Minuten vor Sarin vermochte die Sarin-Wirkung auf den Blutdruck nicht zu beeinflussen.

Eine Bindung von Obidoxime an Serumalbumin konnte nicht nachgewiesen werden. Verdrängungsexperimente am isolierten nikotinischen Azetylcholin-Rezeptor offenbarten die cholinerge Spezifität von Obidoxime. Die Affinität von Obidoxime war aber im Vergleich zu Azetylcholin um einen Faktor 1000 kleiner.

Eine direkte Wechselwirkung zwischen Obidoxime und Sarin konnte in vitro verfolgt werden. Verschiedene analytische Methoden ergaben, dass in wässriger Lösung bei physiologischem pH beide Oxim-Gruppen von Obidoxime mit Sarin phosphonyliert werden. Mono-phosphonyliertes Obidoxime zerfiel aber schnell mit einer Halbwertszeit von  $t_{1/2}=13.1\text{min}$ , während di-phosphonyliertes Obidoxime wesentlich schneller zerfiel (Messungen mit  $^{31}\text{P}$ -NMR).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Wirkung von Obidoxime in Sarin vergifteten Tieren hauptsächlich in der Peripherie liegt einerseits mit einer entgiftenden "Abfangreaktion" von freien Sarin Molekülen und andererseits mit blockierenden Effekten an den Ganglien und "curare-artigen" Effekten an der postsynaptischen Membran.