

**UNIVERZITET U BEOGRADU – FARMACEUTSKI FAKULTET
NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE**

Beograd, 15.05.2019. godine

Odlukom Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta br. 599/2 od 11.04.2019. godine, donetoj na sednici Veća održanoj 11.04.2019. godine, imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Evice Antonijević pod naslovom „Antidotska efikasnost novosintetisanih oksima K203 i K027 kod pacova akutno trovanih dihlorvosom“, u sastavu:

1. Dr sc. Biljana Antonijević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor
2. Dr sc. Danijela Đukić-Ćosić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Slavica Vučinić, redovni profesor, Univerzitet odbrane u Beogradu – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije.

Na osnovu analize dostavljenog materijala Komisija podnosi sledeći

IZVEŠTAJ

1. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dipl. farm. Evice Antonijević pod naslovom „Antidotska efikasnost novosintetisanih oksima K203 i K027 kod pacova akutno trovanih dihlorvosom“ sadrži 176 strana i organizovana je u sedam poglavlja: 1. Uvod, 2. Hipoteza i cilj istraživanja, 3. Materijal i metode, 4. Rezultati, 5. Diskusija, 6. Zaključci i 7. Literatura. Pored ovoga, doktorska disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, sadržaj poglavlja i potpoglavlja, biografiju autora, izjavu o autorstvu, izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije i izjavu o korišćenju. Doktorska disertacija ukupno sadrži 31 tabelu i 77 slika.

U Uvodu su pregledno dati relevantni literaturni podaci koji obuhvataju i najnovija saznanja o specifičnoj terapiji akutnih trovanja organofosfornim jedinjenjima. U ovom

poglavljju opisan je toksikološki značaj organofosfornih (OF) jedinjenja, koja se upotrebljavaju kao pesticidi, a predstavnici sa visokom akutnom toksičnosti takođe uključuju nervne bojne otrove. Opisani su mehanizmi toksičnog dejstva OF, među kojima kao najznačajniji inhibicija enzima acetilholinesteraze (AChE), ali i nespecifični mehanizam toksičnog dejstva, kao što je izazivanje oksidativnog stresa. Opisana je, dalje, klinička slika akutnog trovanja organofosfatima i standardni pristup antidotskoj terapiji. U uvodu je posebno ukazano na to da je i nakon 60 godina od pojave prvog specifičnog antidota – oksima – reaktivatora AChE inhibirane organofosfatom, terapija akutnog trovanja organofosfatima i dalje predmet intenzivnih istraživanja. Izneti su nalazi eksperimentalnih i kliničkih studija, četiri oksima (pralidoksim, obidoksim, trimedoksim i azoksim), koji su do danas korišćeni kod ljudi, a koji ukazuju na njihovu nezadovoljavajuću i/ili nejednaku efikasnost kod trovanja strukturno različitim OF, te je ukazano na značajne napore istraživača za sintetisanje i ispitivanje novih oksimskih struktura, kao potencijalnih antidota kod trovanja OF. U cilju pronalaženja jedinjenja sa boljim antidotskim karakteristikama i/ili širim spektrom dejstva u odnosu na standardne oksime, posebno je istaknut razvoj dva novosintetisana eksperimentalna oksima, K203 i K027, koji su dali obećavajuće rezultate u *in vitro* ispitivanjima kod OF pesticida, a i u *in vivo* ispitivanjima kod nervnih agenasa. Naglašena je činjenica da ova dva oksima još uvek nisu ispitana *in vivo* na modelu OF pesticida. U uvodu je, takođe, ukazano na najnovije nalaze *in vitro* i *in vivo* ispitivanja o potencijanoj antioksidativnoj efikasnosti oksima, koja bi mogla doprineti kompleksnijem sagledavanju mehanizama koji utiču na njihov ukupni antidotski efekat.

Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji bio je da se ispita potencijalna *in vivo* terapijska i reaktivatorska efikasnost, kao i antioksidativni kapacitet oksima K203 i K027 kod pacova akutno trovanih dihlorvosom (DDVP), kao modelom pesticida, koji direktno inhibiraju AChE. Ispitivanja antidotske efikasnosti su sprovedena pod istim eksperimentalnim uslovima i sa standardnim oksimima – pralidoksimom, obidoksimom, trimedoksimom i azoksimom – u cilju poređenja sa novosintetisanim oksimima K203 i K027. U svrhu realizacije postavljenog cilja bilo je neophodno: ispitati terapijske indekse oksima i/ili atropina; ispitati potencijal oksima, kao i njihove kombinacije sa atropinom, u reaktivaciji inhibirane AChE eritrocita, dijafragme i mozga; ispitati potencijal oksima, kao i njihove kombinacije sa atropinom, u reaktivaciji butirilholinesteraze (BuChE) plazme; ispitati potencijalni antioksidativni efekat oksima, kao i njihove kombinacije sa atropinom, u plazmi, dijafragmi i mozgu; ispitati doznu zavisnost navedenih efekata oksima i definisati relevantne dozne nivoe za sve ispitivane efekte i ispitati značaj i stepen povezanosti navedenih efekata oksima.

U poglavljju Materijal i metode opisan je eksperimentalni model koji je korišćen za *in vivo* ispitivanje, eksperimentalni dizajn i detaljno su opisane sve eksperimentalne procedure. Eksperimenti su izvođeni na laboratorijskim pacovima (*Rattus norvegicus*) soja *Wistar*, muškog pola. Sve primenjene procedure bile su odobrene od strane Etičkog

komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta (No. 323-07-00363/2017-05) i sprovedene su u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja R. Srbije („Sl. Glasnik R. Srbije“, broj 41/09). U ovom poglavlju opisano je ispitivanje akutne toksičnosti oksima, terapijskog potencijala oksima, reaktivatorskog efekta oksima sa metodama određivanja aktivnosti AChE u uzorcima eritrocita, dijafragme i mozga, kao i aktivnosti BuChE u uzorcima plazme. Opisan je i način izdvajanja i pripreme korišćenih bioloških uzoraka: eritrocita, plazme, dijafragme i mozga. U cilju ispitivanja antioksidativnog efekta oksima opisane su metode određivanja prooksidativnih biomarkera – superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) i totalni oksidativni status (TOS); enzimskih i neenzimskih antioksidativnih biomarkera – aktivnost enzima superoksid dismutase (SOD), ukupne sulfhidrilne grupe (-SH), totalni antioksidativni status (TAS) i aktivnost enzima paraoksonaze (PON), kao i pokazatelja opterećenja tkiva oksidativnim stresom – prooksidativno oksidativni balans (PAB) i indeks oksidativnog stresa (OSI). Dodatno, kao mera oksidativnog oštećenja tkiva opisane su metode određivanja malondialdehida (MDA), proizvoda procesa lipidne peroksidacije i uznapredovalih produkata oksidacije proteina (eng. *advanced oxidation protein products*, AOPP). Za statističku analizu podataka korišćeni su programi PHARM (Pharmacologic Calculation System, ver.4.0, 1986 Springer-Verlag, New York, SAD), SPSS 18.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois), a za grafičko prikazivanje rezultata korišćen je softver GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA, USA). Za kvantitativnu statističku analizu odnosa doza-efekat metodologijom *Benchmark* doze, korišćen je softver PROAST verzija 65.5 (*Dutch National Institute for Public Health i the Environment (RIVM)*, Bilthoven, Holandija).

Rezultati su, osim tekstualno, predstavljeni tabelarno i grafički, kroz 27 tabela i 74 slike. Ovo poglavlje organizovano je u šest potpoglavlja: Akutna toksičnost oksima; Terapijski potencijal oksima kod pacova trovanih dihlorvosom; Reaktivatorska efikasnost oksima K203 i K027 kod pacova trovanih dihlorvosom; Antioksidativni potencijal oksima kod pacova trovanih dihlorvosom i Antioksidativna efikasnost oksima K203 i K027 kod pacova trovanih dihlorvosom.

U Diskusiji su rezultati dobijeni istraživanjima u sklopu ove doktorske disertacije sagledani u kontekstu podataka dobijenih u drugim istraživanjima i objavljenih u relevantnim međunarodnim časopisima. U ovom poglavlju sagledan je značaj dobijenih rezultata, ali i njihova ograničenja, kako bi se doneli odgovarajući zaključci u skladu sa postavljenim ciljem istraživanja.

U sklopu dela doktorske disertacije Zaključci sumirani su najvažniji rezultati istraživanja. Navedeni zaključci jasno ukazuju da su ciljevi istraživanja realizovani u visokom stepenu.

U Literaturi su navedene 284 bibliografske jedinice i korišćen je harvardski stil citiranja.

2. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije obuhvataju rezultate: akutne toksičnosti oksima, terapijskog potencijala oksima, reaktivatorskog potencijala oksima, reaktivatorske *benchmark* doze oksima K203 i K027, antioksidativnog potencijala oksima i antioksidativne *benchmark* doze oksima K203 i K027 kod pacova trovanih dihlorvosom.

Oksim K027 je pokazao najmanju akutnu intramuskularnu (*i.m.*) toksičnost kod *Wistar* pacova, koja se smanjivala sledećim redosledom: obidoksim > trimedoksim > oksim K203 > pralidoksim > azoksim > oksim K027.

Oksim K027 je bio najefikasniji u antagonizovanju akutne toksičnosti DDVP-a, dok je terapijska efikasnost oksima K203 bila veća od efikasnosti trimedoksima, pralidoksima i azoksima, navedenih redosledom opadajućih vrednosti terapijskih indeksa. Ipak, statistički značajano veći terapijski indeks oksima K203 dobijen je samo u odnosu na azoksim. Među standardno korišćenim oksimima, najbolju terapijsku efikasnost pokazao je obidoksim, dok je sa druge strane, azoksim pokazao najmanju sposobnost da antagonizuje akutnu toksičnost DDVP-a kod pacova.

Uključivanje antiholinergičkog leka, atropina, uz oksim, jasno je poboljšalo terapijski efekat antidotskog tretmana protiv akutne toksičnosti DDVP-a. Sam atropin smanjio je akutnu toksičnost DDVP-a oko deset puta. Dodavanje oksima K203, trimedoksima, pralidoksima ili azoksima, dovelo je do povećanja terapijskog indeksa oko tri puta u odnosu na sam atropin. Najveća stopa preživljavanja životinja akutno trovanih DDVP-om dobijena je kada je oksim K027 ili obidoksim primenjen u kombinaciji sa atropinom, pri čemu su terapijski indeksi ova dva oksima bili približno jednaki.

Značajna reaktivacija enzima AChE, inhibirane dejstvom DDVP-a, postignuta je samo oksimom K027 ili njegovom kombinacijom sa atropinom, u odnosu na sve druge ispitivane oksime, i to u eritrocitima i dijafragmi. Nivo reaktivacije AChE u mozgu pacova postignut oksimom K027, samostalno ili u kombinaciji sa atropinom, se nije značajno razlikovala ni od nivoa u grupi tretiranoj samo DDVP-om, niti u grupama tretiranim oksimom K203, obidoksimom, trimedoksimom, pralidoksimom ili azoksimom. Značajan porast aktivnosti BuChE inhibirane DDVP-om dobijen je nakon tretmana oksimom K027, K203 ili obidoksimom, kao i njihovim kombinacijama sa atropinom.

Oksimi K027 i K203 dozno zavisno su reaktivirali AChE eritrocita, dijafragme i mozga, kao i BuChE plazme. Dozna zavisnost reaktivacije AChE eritrocita, dijafragme i mozga K-oksimuma bila je opisana petoparametarskim modelom, dok je dozna zavisnost reaktivacije BuChE bila opisana troparametarskom modelom iz eksponencijalne i *Hill*-ove familije modela. Za efekat reaktivacije AChE na nivou eritrocita, dijafragme i mozga, dve krive doza-efekat koje odgovaraju oksimuma K203 i K027, značajno su se razlikovale u položaju krive ukazujući da se oksimi razlikuju u potentnosti da reaktiviraju

AChE inhibiranu DDVP-om. Oksimi K203 i K027 nisu pokazali razliku u potentnosti za efekat reaktivacije BuChE u plazmi.

Maksimalna reaktivacija AChE eritrocita oksimima K203 i K027 iznosila je 2,5 puta i tri izračunata nivoa intenziteta efekta reaktivacije bila su: jak efekat 58%, umeren efekat 26% i slab efekat 12%. Doze kritičnog efekta (eng. *critical effect dose*, CED) pri kojima oksimi K027 i K203 ostvaruju prethodno definisane intenzitete efekta reaktivacije eritrocitne AChE iznosile su: za oksim K027 $CED_{58}=52 \mu\text{mol/kg}$, $CED_{26}=24 \mu\text{mol/kg}$ i $CED_{12}=12 \mu\text{mol/kg}$, a za oksim K203 $CED_{58}=100 \mu\text{mol/kg}$, $CED_{26}=46 \mu\text{mol/kg}$ i $CED_{12}=24 \mu\text{mol/kg}$. Isti intenzitet efekta postignut je nižom dozom oksima K027, pokazujući veću reaktivatorsku potentnost oksima K027 u eritrocitima. Na osnovu vrednosti relativnog faktora potentnosti, oksim K027 pokazao je oko 2 puta veću potentnost u odnosu na oksim K203 za reaktivaciju AChE inhibirane DDVP-om u eritrocitima. Međutim, jedino pri efektu jakog intenziteta nije dobijeno preklapanje intervala pouzdanosti izračunatih dozvoljavajući statistički podržan rang veće potentnosti oksima K027 u poređenju sa oksimom K203.

Maksimalna reaktivacija AChE dijafragme oksimima K203 i K027 iznosila je 2,1 puta i tri izračunata nivoa intenziteta efekta reaktivacije bila su: jak efekat 45%, umeren efekat 20% i slab efekat 10%. Doze pri kojima oksimi K027 i K203 ostvaruju tri prethodno definisana intenziteta efekta reaktivacije AChE dijafragme iznosile su: za oksim K027 $CED_{45}=18 \mu\text{mol/kg}$, $CED_{20}=6 \mu\text{mol/kg}$ i $CED_{10}=3 \mu\text{mol/kg}$, a za oksim K203 $CED_{45}=100 \mu\text{mol/kg}$, $CED_{20}=34 \mu\text{mol/kg}$ i $CED_{10}=15 \mu\text{mol/kg}$. Isti intenzitet efekta reaktivacije AChE dijafragme se postiže nižom dozom oksima K027 u poređenju sa dozom oksima K203 i izračunati relativni faktor potentnosti oksima K027 u odnosu na oksim K203 za reaktivaciju AChE inhibirane DDVP-om u dijafragmi iznosio je oko 5 puta. Poređenjem intervala pouzdanosti izračunatih CED dva K-oksima dobijeno je da se oni ne preklapaju jedino pri jakom intenzitetu dozvoljavajući statistički podržan rang veće potentnosti oksima K027 u poređenju sa oksimom K203 za reaktivaciju AChE dijafragme.

Maksimalna reaktivacija AChE mozga K-oksimuma iznosila je 1,5 puta i tri izračunata nivoa intenziteta efekta reaktivacije bila su: jak efekat 22%, umeren efekat 11% i slab efekat 5%. Doze pri kojima oksimi K027 i K203 ostvaruju prethodno definisane intenzitete efekta reaktivacije AChE mozga iznosile su: za oksim K027 $CED_{22}=90 \mu\text{mol/kg}$, $CED_{11}=54 \mu\text{mol/kg}$ i $CED_5=33 \mu\text{mol/kg}$, a za oksim K203 $CED_{22}=179 \mu\text{mol/kg}$, $CED_{11}=108 \mu\text{mol/kg}$ i $CED_5=66 \mu\text{mol/kg}$. Isti intenzitet efekta postignut je nižom dozom oksima K027 u poređenju sa dozom oksima K203, što je pokazalo veću reaktivatorsku potentnost oksima K027 u mozgu. Na osnovu vrednosti relativnog faktora potentnosti, oksim K027 pokazao je oko 2 puta veću potentnost u odnosu na oksim K203 za reaktivaciju AChE inhibirane DDVP-om u mozgu. Poređenjem intervala pouzdanosti izračunatih CED dobijeno je da se jedno pri jakom intenzitetu

efekta oni ne preklapaju dozvoljavajući statistički podržan rang veće potentnosti oksima K027 u poređenju sa oksimom K203 za reaktivaciju AChE mozga.

Maksimalna reaktivacija BuChE plazme K-oksima iznosila je 1,8 puta i tri izračunata nivoa intenziteta efekta reaktivacije bila su: jak efekat 36%, umeren efekat 17% i slab efekat 8%. Doze pri kojima oksimi K027 i K203 ostvaruju prethodno definisane intenzitete efekata reaktivacije BuChE plazme su: za oksim K027 $CED_{36}=665 \mu\text{mol/kg}$, $CED_{17}=59 \mu\text{mol/kg}$ i $CED_8=5 \mu\text{mol/kg}$, a za oksim K203 $CED_{36}=1822 \mu\text{mol/kg}$, $CED_{17}=162 \mu\text{mol/kg}$ i $CED_8=12 \mu\text{mol/kg}$. Isti intenzitet efekta reaktivacije BuChE postignut je nižom dozom oksima K027 u poređenju sa dozom oksima K203. Međutim, dobijeni su prilično široki intervali pouzdanosti izračunatih doza oksima K027 i K203, naročito za oksim K203, i dodatno, preklapali su se za sva tri intenziteta efekta, što je ukazalo na to da se značajna razlika u njihovoj potentnosti da reaktiviraju BuChE u plazmi nije mogla utvrditi.

Kada su rastuće doze oksima K203 i K027 primenjene uz 10 mg/kg atropina takođe je dobijena dozno zavisna reaktivacija AChE eritrocita, dijafragme i mozga, kao i BuChE plazme, s tim da dozno zavisni model, parametri modela, kao i dobijene ekviefektivne doze nisu bile značajno različite od vrednosti koje su dobijene kada su K-oksimi primenjeni samostalno.

Nakon supkutanog davanja DDVP-a u dozi 75% srednje letalne doze (LD_{50}), pokazano je stanje oksidativnog stresa u plazmi, dijafragmi i mozgu, na osnovu najvećeg broja merenih prooksidativnih i antioksidativnih biomarkera, kao i indeksa oksidativnog stresa. Oksidativno oštećenje ćelijskih makromolekula usled trovanja DDVP-om pokazano je u plazmi na osnovu značajno povišenih nivoa MDA i AOPP, a u dijafragmi i mozgu na osnovu značajno povišenih nivoa MDA u odnosu na vrednosti dobijene kod kontrolne grupe životinja.

Generalno posmatrano svi ispitivani oksimi, eksperimentalni K-oksimi i standardni oksimi, primenjeni u dozi 5% LD_{50} , pokazali su potencijal da umanje oksidativni stres na osnovu vrednosti prooksidativnih, antioksidativnih biomarkera i posledično na izračunatu vrednost indeksa oksidativnog stresa. Razlika u njihovom potencijalu na nivou dijafragme uočava se na nivou ukupnog antioksidativnog kapaciteta, koji su značajno povećali K-oksimi, pralidoksim i azoksim. Na nivou plazme različit antioksidativni potencijal oksima se tek uočava na osnovu biomarkera oštećenja ćelijskih makromolekula, gde je jedino obidoksim značajno zaštitio lipide plazme pacova od peroksidacije indukovane DDVP-om, dok su oksidativno oštećenje proteina smanjili jedino oksim K027 i azoksim. U mozgu pacova, oksimi su se razlikovali u antioksidativnom potencijalu na nivou pojedinačnih biomarkera. Trimedoksim, pralidoksim i azoksim su u mozgu smanjili povišene nivoe prooksidanasa, ali u isto vreme nisu uticali na komponente antioksidativnog sistema zaštite. Sa druge strane oksim K027 i obidoksim su u mozgu održali kontrolni nivo oksidativnog stresa, značajnim povećanjem totalnog antioksidativnog kapaciteta u mozgu pacova, bez značajnog uticaja

na prooksidanse. Jedino je oksim K203 održao kontrolni nivo oksidativnog stresa (na osnovu OSI vrednosti) u mozgu, uticajem i na ukupni oksidativni i antioksidativni status. Svi oksimi, osim obidoksima, su u mozgu smanjili oksidativno oštećenje lipida uzrokovano dejstvom DDVP-a, dok status uznapredovalih produkata oksidacije proteina je ostao nepromenjen nakon oksimske terapije.

Primena samo atropina umanjila je intenzitet oksidativnog stresa na nivou sva tri ispitivana tkiva, kada se posmatra većina pojedinačnih prooksidativnih i antioksidativnih biomarkera. Međutim, moglo se uočiti da ovo nije bilo dovoljno i za odražavanje efekta na proces lipidne peroksidacije i oksidativnog oštećenja proteina, s obzirom da su nivoi MDA, u plazmi i dijafragmi, i AOPP, u sva tri tkiva, nakon tretmana atropinom ostali na nivou DDVP-tretirane grupe životinja.

Nakon davanja atropina sa oksimima u ekvivalentnoj dozi dobijena je veoma heterogena slika redoks statusa u ispitivanim tkivima. Povišene nivoe MDA u plazmi pacova tretiranih DDVP-om, smanjili su značajno u kombinaciji sa atropinom jedino obidoksim i trimedoksim, dok su povišeni nivoi AOPP-a ostali visoki i nakon davanja oksima sa atropinom. Jedino je kombinacija obidoksima i atropina zaštitila lipide dijafragme od peroksidacije. Oksimi K027, K203, trimedoksim i pralidoksim dati sa atropinom značajno su smanjili povišen nivo MDA u mozgu pacova trovanih DDVP-om, na nivoe jednake kontrolnim vrednostima.

Kvantitativnom analizom antioksidativne efikasnosti oksima K203 i K027 identifikovani su opsezi doza oba ispitivana K-oksima pri kojima je značajno popravljen redoks status plazme, dijafragme i mozga pacova, a prethodno narušen izlaganjem životinja subletalnoj dozi DDVP-a. Međutim, velika heterogenost rezultata u pogledu postojanja uticaja oksima na pojedinačne biomarkere oksidativnog stresa, postojanja dozne zavisnosti tog uticaja, razlike u veličini ekvivalentnih doza jednog oksima za različite biomarkere ukazuje na kompleksnost redoks homeostaze na nivou različitih tkiva organizma, kao i kompleksnost karakterizacije ovakvog mehanizma dejstva oksimskih reaktivatora.

Ipak, visoko konzistentan nalaz unutar ove studije dobijen je kvantitativnim poređenjem antioksidativne efikasnosti dva K-oksima pri čemu je oksim K203 pokazao veću antioksidativnu potentnost/nišu ekvivalentnu dozu na nivou sva tri ispitivana tkiva.

3. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Oksimi K203 i K027 su primarno sintetisani i testirani protiv OF nervnih agenasa (Kuča i sar., 2003; Musilek i sar., 2007b). Pokazano je da je oksim K203 dobar reaktivator tabunom inhibirane AChE *in vitro* i *in vivo* (Kassa i sar., 2008a; Musilek i sar., 2007a, 2007b, 2008), kao i da smanjuje tabunom indukovani mortalitet kod miševa (Kassa i sar., 2008a; Kovarik i sar., 2009). U pogledu OF pesticida, reaktivatorska

efikasnost oksima K203 je do sada ispitivana samo *in vitro* na paraoksonom-inhibiranoj AChE (Musilek i sar., 2007a; Musilova i sar., 2009). Obećavajući kapacitet oksima K027 u reaktivaciji pesticidima inhibirane AChE dobijen je u nekoliko *in vitro* studija (Jun i sar., 2010; Kuca i sar., 2010; Lorke i sar., 2008a; Petroianu i sar., 2006a, 2007a). Takođe, pokazano je da je oksim K027 uspešno smanjio mortalitet pacova trovanih paraoksonom, metil-paraoksonom i diizopropilfluorofosfatom (Berend i sar., 2008; Kassa, 2006; Lorke i sar., 2008b; Petroianu i sar., 2007b, 2006b). Međutim, samo u jednoj do sada publikovanoj studiji ispitivan je *in vivo* reaktivatorski efekat oksima K027, u kojoj je dobijen veći potencijal od pralidoksima za reaktivaciju paraoksonom inhibirane eritrocitne AChE pacova (Petroianu i sar., 2006b).

Rezultati ove *in vivo* studije pokazali su superiornost oksima K027, datog samostalno, kao i u kombinaciji sa atropinom, u smanjenju DDVP-om indukovanoog mortaliteta u poređenju sa svim standardnim oksimima.

Povoljan terapijski efekat oksima K027, datog samostalno ili u kombinaciji sa atropinom, bio je direktno povezan sa njegovom sposobnošću da reaktivira AChE perifernih tkiva inhibiranu DDVP-om. Aktivnost AChE u eritrocitima pacova koje su tretirane oksimom K027 je dostigla 70% aktivnosti kontrole, a u dijafragmi je iznosila 50% kontrolne aktivnosti. Postoje nalazi da je aktivnost AChE eritrocita iznad 30-40% kontrolnog nivoa bila povezana sa normalnom mišićnom funkcijom kod pacijenata trovanih OF pesticidima (Thiermann i sar., 2005, 2009), dok *in vitro* aktivnost AChE dijafragme miša 30-40% kontrolnog nivoa oporavlja mišićnu funkciju u prisustvu paraoksiona (Thiermann i sar., 2010).

Sa druge strane, nizak nivo reaktivacije AChE u mozgu pacova dobijen u našoj studiji (7-9%), konzistentan je sa nalazima *in vitro* studija, u kojima je oksim K027, pri nižim testiranim koncentracijama koje se smatraju dostižnim u mozgu (10^{-5} - 10^{-4} M), reaktivirao AChE inhibiranu DDVP-om do 5% u homogenatima mozga pacova (Atanasov i sar., 2013; Kuca i sar., 2010). Međutim, pri višoj koncentraciji oksima K027 ispitivanoj *in vitro* (10^{-3} M), koja se smatra irelevantnom za većinu oksima zbog njihove intrinzične toksičnosti, dobijena je reaktivacija od 26% DDVP-om inhibirane AChE u homogenatima mozga pacova (Kuca i sar., 2010). Pokazano je da je najmanji nivo aktivnosti AChE u pontomedularnoj regiji, koji je neophodan za preživljavanje miševa trovanih nervnim agensom bio u opsegu 5-20% (Bajgar, 1991; Bajgar i sar., 1975, 1972, 1971).

Pored dobrog reaktivatorskog potencijala oksima K027, rezultati ove studije pokazali su da, pri *i.m.* primeni, oksim K027 poseduje najmanju akutnu toksičnost među ispitivanim oksimima, manju čak i od azoksima, koji se smatra najmanje toksičnim standardnim oksimom za sisare (Eyer i Worek, 2007). Akutna *i.m.* toksičnost oksima K203 je bila niža od toksičnosti trimedoksima i obidoksima, ali istovremeno viša od toksičnosti oksima K027, pralidoksima i azoksima. Ovi nalazi su u saglasnosti sa nalazima drugih studija o akutnoj toksičnosti oksima K027 i K203 na pacovima pri *i.m.*,

ali i intraperitonealnom (*i.p.*) putu primene (Kassa i sar., 2008a; Lorke i sar., 2008b; Musilek i sar., 2007b). Kod miševa je pokazana manja akutna toksičnost oksima K027 od trimedoksima pri *i.p.*, a od azoksima i pri *i.p.* i *i.m.* primeni (Čalić i sar., 2006; Kassa i sar., 2018). Oksim K203 kod miševa je pokazao veću toksičnost od azoksima, ali i od trimedoksima i obidoksima, što nije slučaj kada je akutna toksičnost ispitivana na modelu pacova pri *i.m.* primeni (Kassa i sar., 2008a, 2009a, 2010). Kod miševa pri *i.p.* primeni oksim K203 pokazuje akutnu toksičnost približno jednaku trimedoksimu (Kovarik i sar., 2009).

Sumarno, oba eksperimentalna K-oksima su u ovoj studiji, zajedno sa azoksimom, pokazala manju akutnu toksičnost od obidoksima i trimedoksima, koji se smatraju najefikasnijim reaktivatorima kod OF pesticida, ali istovremeno i najtoksičnijim među standardnim oksimima (Eyer i Worek, 2007; Worek i sar., 2007).

Niska akutna toksičnost eksperimentalnih K-oksima predstavlja značajan nalaz sa aspekta terapijskog doziranja do željenog nivoa efekta, s obzirom da stopa reaktivacije AChE zavisi od koncentracije oksima na aktivnom mestu enzima.

Međutim, u evaluaciji terapijske efikasnosti oksimskih reaktivatora ne postoji ispitivanje različitih doznih nivoa, a poređenje oksima je otežano heterogenošću eksperimentalnih metodologija/dizajna studija/protokola (Worek i Thiermann, 2013).

Stoga su u ovoj studiji, nasuprot do sada objavljenim *in vivo* eksperimentalnim protokolima, koji su ispitivali jednu ili ređe dve doze, ispitani efekti šest različitih doza oksima K203 i K027 (Berend i sar., 2012; Kassa i sar., 2008b; Kovarik i sar., 2009; Petroianu i sar., 2006b, 2007b) i kvantitativno je evaluirana *in vivo* efikasnost eksperimentalnih oksima K203 i K027. Ovakva evaluacija omogućila je modelovanje dozne zavisnosti efekata, kvantifikovanje intenziteta efekata i ekvivalentnih doza i konačno, precizno poređenje njihove antidotske efikasnosti.

Najnovija istraživanja mehanizama dejstva oksima, uzimaju u obzir i nalaze da OF, pored inhibicije AChE, ometaju ćelijske redoks procese (Abdollahi i sar., 2004; Karami-Mohajeri i Abdollahi, 2013; Lukaszewicz-Hussain, 2010; Soltaninejad i Abdollahi, 2009). Dodatno, u *in vitro* i *ex vivo* eksperimentima pokazano je da oksimi poseduju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (de Lima Portella i sar., 2008; Özen i Taş, 2009; Puntel i sar., 2009, 2008). Zbog ovoga je pretpostavljeno da antioksidativne osobine oksimskih reaktivatora mogu doprineti tretmanu intoksikacija OF.

Dosadašnja slika DDVP-om indukovano oksidativnog stresa nakon akutne *in vivo* ekspozicije (Cankayali i sar., 2005; Hasan i Ali, 1981; Masoud i sar., 2009), ovom studijom je potvrđena i dopunjena podacima o dodatnim biomarkerima na nivou ne samo najčešće ispitivanih ciljnih tkiva, krvi i mozga, već i dijafragme.

Rezultati ove studije o antioksidativnim potencijalima oksima K203, K027 i standardnih oksima kod trovanja DDVP-om u saglasnosti su sa malobrojnim do sada dostupnim *in vivo* ispitivanjima kod trovanja tabunom i malationom na glodarima (Berend i sar., 2012; da Silva i sar., 2008; dos Santos i sar., 2011; Pohanka i sar., 2009,

2011). Međutim, sagledavanjem eksperimentalnih protokola navedenih *in vivo* studija, uočava se da su sve one ograničene na određivanje samo komponenata antioksidativnog sistema zaštite i/ili proizvoda lipidne peroksidacije kao biomarkera oksidativnog stresa. Dodatno, u svim protokolima navedenih studija oksimi su primenjivani u kombinaciji sa atropinom, koji je mogao imati udela u dobijenim efektima. Stoga je poseban značaj ove studije u jedinstvenim podacima o antioksidativnom potencijalu oksima primenjenih samostalno, ali i u kombinaciji sa atropinom, kao i jedinstvenim podacima o njihovom efektu na veliki broj prooksidativnih i antioksidativnih biomarkera stanja oksidativnog stresa.

Ova studija dala je i jedinstvenu kvantitativnu evaluaciju antioksidativne efikasnosti oksima K203 i K027 kod pacova trovanih DDVP-om. Međutim, s obzirom na kompleksnost oksidativnog stresa, dalja istraživanja su neophodna u cilju razumevanja ćelijskih i subćelijskih mehanizama koji leže u osnovi različite efikasnosti oksima prema različitim OF jedinjenjima.

Literatura

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaiee, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Rev.* 10, RA141–RA147.
- Atanasov, V.N., Petrova, I., Dishovsky, C., 2013. In vitro investigation of efficacy of new reactivators on OPC inhibited rat brain acetylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.*, 11th International Meeting on Cholinesterases 203, 139–143.
- Bajgar, J., 1991. The influence of inhibitors and other factors on cholinesterases. *Sb. Vedeckych Pr. Lek. Fak. Karlovy Univ. V Hradci Kralove* 34, 5–77.
- Bajgar, J., Jakl, A., Hrdina, V., 1972. The influence of obidoxime on acetylcholinesterase activity in different parts of the mouse brain following isopropylmethyl phosphonofluoridate intoxication. *Eur. J. Pharmacol.* 19, 199–202.
- Bajgar, J., Jakl, A., Hrdina, V., 1971. Influence of trimedoxime and atropine on acetylcholinesterase activity in some parts of the brain of mice poisoned by isopropylmethyl phosphonofluoridate. *Biochem. Pharmacol.* 20, 3230–3233.
- Bajgar, J., Patocka, J., Jakl, A., Hrdina, V., 1975. Antidotal therapy and changes of acetylcholinesterase activity following isopropyl methylphosphonofluoridate intoxication in mice. *Acta Biol. Med. Ger.* 34, 1049–1055.
- Berend, S., Lucić Vrdoljak, A., Musilek, K., Kuča, K., Radić, B., 2012. Effects of oxime K203 and oxidative stress in plasma of tabun poisoned rats. *Croat. Chem. Acta* 85, 193–199.
- Berend, S., Vrdoljak, A.L., Radić, B., Kuča, K., 2008. New bispyridinium oximes: in vitro and in vivo evaluation of their biological efficiency in soman and tabun poisoning. *Chem. Biol. Interact.* 175, 413–416.

- Čalić, M., Vrdoljak, A.L., Radić, B., Jelić, D., Jun, D., Kuča, K., Kovarik, Z., 2006. In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun-and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. *Toxicology* 219, 85–96.
- Cankayali, L., Demirag, K., Eris, O., Ersoz, B., Moral, A.R., 2005. The effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in organophosphate poisoning model. *Adv. Ther.* 22, 107–116.
- da Silva, Aline P., Farina, M., Franco, J.L., Dafre, A.L., Kassa, J., Kuca, K., 2008. Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion-induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex. *NeuroToxicology* 29, 184–189.
- de Lima Portella, R., Barcelos, R.P., de Bem, A.F., Carratu, V.S., Bresolin, L., da Rocha, J.B.T., Soares, F.A.A., 2008. Oximes as inhibitors of low density lipoprotein oxidation. *Life Sci.* 83, 878–885.
- dos Santos, A.A., dos Santos, D.B., Ribeiro, R.P., Colle, D., Peres, K.C., Hermes, J., Barbosa, A.M., Dafré, A.L., de Bem, A.F., Kuca, K., Farina, M., 2011. Effects of K074 and pralidoxime on antioxidant and acetylcholinesterase response in malathion-poisoned mice. *NeuroToxicology* 32, 888–895.
- Eyer, P.A., Worek, F., 2007. Oximes, in: *Chemical Warfare Agents*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 305–329.
- Hasan, M, Ali, S., 1981. Organophosphate pesticide dichlorvos-induced increase in the rate of lipid peroxidation in the different regions of the rat brain: supporting ultrastructural findings. *Neurotoxicology* 2, 43–52.
- Jun, D., Musilova, L., Pohanka, M., Jung, Y.-S., Bostik, P., Kuca, K., 2010. Reactivation of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by leptophos-oxon with different oxime reactivators in vitro. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2856–2863.
- Karami-Mohajeri, S., Abdollahi, M., 2013 . Mitochondrial dysfunction and organophosphorus compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 270, 39–44.
- Kassa, J., 2006. The influence of oxime and anticholinergic drug selection on the potency of antidotal treatment to counteract acute toxic effects of tabun in mice. *Neurotox. Res.* 9, 59–62.
- Kassa, J., Karasova, J., Musilek, K., Kuca, K., 2008a. An evaluation of therapeutic and reactivating effects of newly developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice. *Toxicology* 243, 311–316.
- Kassa, J., Karasova, J., Musilek, K., Kuca, K., 2008b. An evaluation of therapeutic and reactivating effects of newly developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice. *Toxicology* 243, 311–316.

- Kassa, J., Karasova, J.Z., Caisberger, F., Bajgar, J., 2009a. The influence of combinations of oximes on the reactivating and therapeutic efficacy of antidotal treatment of soman poisoning in rats and mice. *Toxicol. Mech. Methods* 19, 547–551.
- Kassa, J., Karasova, J.Z., Caisberger, F., Musilek, K., Kuca, K., Jung, Y.-S., 2010. A comparison of reactivating and therapeutic efficacy of the oxime K203 and its fluorinated analog (KR-22836) with currently available oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) against tabun in rats and mice. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25, 480–484.
- Kassa, J., Korabecny, J., Nepovimova, E., Jun, D., 2018. The influence of modulators of acetylcholinesterase on the resistance of mice against soman and on the effectiveness of antidotal treatment of soman poisoning in mice. *J. Appl. Biomed.* 16, 10–14.
- Kovarik, Z., Vrdoljak, A., Berend, S., Katalinić, M., Kuč, K., Musilek, K., Radić, B., 2009. Evaluation of oxime K203 as antidote in tabun poisoning. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 60, 19–26.
- Kuča, K., Bielavský, J., Cabal, J., Bielavská, M., 2003. Synthesis of a potential reactivator of acetylcholinesterase—1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(carbamoylpyridinium)propane dibromide. *Tetrahedron Lett.* 44, 3123–3125.
- Kuca, K., Musilek, K., Jun, D., Pohanka, M., Ghosh, K.K., Hrabínova, M., 2010. Oxime K027: novel low-toxic candidate for the universal reactivator of nerve agent- and pesticide-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25, 509–512.
- Lorke, D.E., Hasan, M.Y., Arafat, K., Kuča, K., Musilek, K., Schmitt, A., Petroianu, G.A., 2008a. In vitro oxime protection of human red blood cell acetylcholinesterase inhibited by diisopropyl-fluorophosphate. *J. Appl. Toxicol.* 28, 422–429.
- Lorke, D.E., Nurulain, S.M., Hasan, M.Y., Kuča, K., Musilek, K., Petroianu, G.A., 2008b. Eight new bispyridinium oximes in comparison with the conventional oximes pralidoxime and obidoxime: in vivo efficacy to protect from diisopropylfluorophosphate toxicity. *J. Appl. Toxicol.* 28, 920–928.
- Lukaszewicz-Hussain, A., 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98, 145–150.
- Masoud, A., Kiran, R., Sandhir, R., 2009. Impaired Mitochondrial Functions in Organophosphate Induced Delayed Neuropathy in Rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 29, 1245–1255.
- Musilek, Kamil, Holas, O., Jun, D., Dohnal, V., Gunn-Moore, F., Opletalova, V., Dolezal, M., Kuca, K., 2007a. Monooxime reactivators of acetylcholinesterase with (E)-but-2-ene linker—Preparation and reactivation of tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6733–6741.
- Musilek, Kamil, Jun, D., Cabal, J., Kassa, J., Gunn-Moore, F., Kuca, K., 2007b. Design of a Potent Reactivator of Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase Synthesis and Evaluation of (E)-1-(4-Carbamoylpyridinium)-4-(4-

- hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene Dibromide (K203). *J. Med. Chem.* 50, 5514–5518.
- Musilek, K., Holas, O., Kuca, K., Jun, D., Dohnal, V., Opletalova, V., Dolezal, M., 2008. Synthesis of monooxime-monocarbamoyl bispyridinium compounds bearing (E)-but-2-ene linker and evaluation of their reactivation activity against tabun-and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 23, 70–76.
- Musilova, L., Kuca, K., Jung, Y.-S., Jun, D., 2009. In vitro oxime-assisted reactivation of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Clin. Toxicol.* 47, 545–550.
- Özen, T., Taş, M., 2009. Screening and evaluation of antioxidant activity of some amido-carbonyl oxime derivatives and their radical scavenging activities. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 24, 1141–1147.
- Petroianu, G.A., Arafat, K., Kuča, K., Kassa, J., 2006a. Five oximes (K-27, K-33, K-48, BI-6 and methoxime) in comparison with pralidoxime: in vitro reactivation of red blood cell acetylcholinesterase inhibited by paraoxon. *J. Appl. Toxicol.* 26, 64–71.
- Petroianu, G.A., Arafat, K., Nurulain, S.M., Kuča, K., Kassa, J., 2007a. In vitro oxime reactivation of red blood cell acetylcholinesterase inhibited by methyl-paraoxon. *J. Appl. Toxicol.* 27, 168–175.
- Petroianu, G.A., Nurulain, S.M., Nagelkerke, N., Al-Sultan, M. a. H., Kuča, K., Kassa, J., 2006b. Five oximes (K-27, K-33, K-48, BI-6 and methoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to the organophosphate paraoxon. *J. Appl. Toxicol.* 26, 262–268.
- Petroianu, G.A., Nurulain, S.M., Nagelkerke, N., Shafiullah, M., Kassa, J., Kuča, K., 2007b. Five oximes (K-27, K-48, obidoxime, HI-6 and trimedoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to methyl-paraoxon. *J. Appl. Toxicol.* 27, 453–457.
- Pohanka, M., Karasova, J.Z., Musilek, K., Kuca, K., Kassa, J., 2009. Effect of five acetylcholinesterase reactivators on tabun-intoxicated rats: induction of oxidative stress versus reactivation efficacy. *J. Appl. Toxicol.* 29, 483–488.
- Pohanka, M., Karasova, J.Z., Musilek, K., Kuca, K., Jung, Y.-S., Kassa, J., 2011. Changes of rat plasma total low molecular weight antioxidant level after tabun exposure and consequent treatment by acetylcholinesterase reactivators. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 26, 93–97.
- Puntel, G.O., Gubert, P., Peres, G.L., Bresolin, L., Rocha, J.B.T., Pereira, M.E., Carratu, V.S., Soares, F.A.A., 2008. Antioxidant properties of oxime 3-(phenylhydrazono) butan-2-one. *Arch. Toxicol.* 82, 755–762.
- Puntel, G.O., de Carvalho, N.R., Gubert, P., Palma, A.S., Corte, C.L.D., Ávila, D.S., Pereira, M.E., Carratu, V.S., Bresolin, L., da Rocha, J.B.T., Soares, F.A.A., 2009. Butane-2,3-dionethiosemicarbazone: An oxime with antioxidant properties. *Chem. Biol. Interact.* 177, 153–160.

- Soltaninejad, K., Abdollahi, M., 2009. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Med. Sci. Rev.* 15, 75–90.
- Thiermann, H., Eyer, P., Worek, F., 2005. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chem. Biol. Interact.* 157–158, 345–347.
- Thiermann, H., Zilker, T., Eyer, F., Felgenhauer, N., Eyer, P., Worek, F., 2009. Monitoring of neuromuscular transmission in organophosphate pesticide-poisoned patients. *Toxicol. Lett.* 191, 297–304.
- Thiermann, H., Eyer, P., Worek, F., 2010. Muscle force and acetylcholinesterase activity in mouse hemidiaphragms exposed to paraoxon and treated by oximes in vitro. *Toxicology* 272, 46–51.
- Worek, F., Eyer, P., Aurbek, N., Szinicz, L., Thiermann, H., 2007. Recent advances in evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning by in vitro analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol., Anticholinesterases* 219, 226–234.
- Worek, F., Thiermann, H., 2013. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacol. Ther.* 139, 249–259.

4. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati doktorske disertacije dipl. farm. Evice Antonijević publikovani su u četiri rada u naučnim časopisima međunarodnog značaja (dva rada u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti, jednom radu u vrhunskom međunarodnom časopisu i jednom radu u istaknutom međunarodnom časopisu):

1. **Antonijević E**, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Vucinic, S, Antonijević B. Therapeutic and reactivating efficacy of oximes K027 and K203 against a direct acetylcholinesterase inhibitor. *NeuroToxicology* 2016; 55:33-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.05.006> (M22) (IF=3,100)
2. **Antonijević E**, Kotur-Stevuljevic J, Musilek K, Kosvancova A, Kuca K, Djukic-Cosic D, Spasojevic-Kalimanovska V, Antonijević B. Effect of six oximes on acutely anticholinesterase inhibitor-induced oxidative stress in rat plasma and brain. *Archives of Toxicology* 2018; 92(2):745-757. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2101-z> (M21a) (IF=5,728)
3. **Antonijević E**, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Curcic M, Cupic Miladinovic D, Bulat Z, Antonijević B. Dose-response modeling of reactivating potency of oximes K027 and K203 against a direct acetylcholinesterase inhibitor

- in rat erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology* 2018; 121: 224-230.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.065> (M21a) (IF=3,977)
4. **Antonijević E**, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Andjelkovic M, Buha Djordjevic A, Antonijević B. Comparison of oximes K203 and K027 based on benchmark dose analysis of rat diaphragmal acetylcholinesterase reactivation. *Chemico Biological Interactions* (In press).
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.034> (M21) (IF=3,296)

Dodatno, rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u šest saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34):

1. **Antonijević E**, Misilek K, Kuca K, Brkić D, Đukić-Ćosić D, Ćurčić M, Antonijević B. The antidotal efficacy of oximes K203 and K027 in rats acutely poisoned with dichlorvos. 11th Serbian Congress of Toxicology, Sremski Karlovci, Serbia, June 24-27, 2014. Abstract book: 130.
2. **Antonijević E**, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Curcic M, Brkic D, Antonijević B. Ability of oxime K027 to reactivate brain AChE in rats acutely poisoned by a direct acetylcholinesterase inhibitor. 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015), Porto, Portugal, September 13-16, 2015. *Toxicology Letters* 2015; Volume 238, No. 2S: S339-40.
3. **Antonijević E**, Kotur-Stevuljevic J, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Jelic-Ivanovic Z, Antonijević B. Effect of six oximes on total antioxidant and total oxidant status in plasma of rats intoxicated with a direct acetylcholinesterase inhibitor. XV International Symposium on Cholinergic Mechanisms, Marseille, France, October 16-20, 2016. Abstract book: 188.
4. **Antonijević E**, Kotur-Stevuljevic J, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Antonijević B. Effect of six oximes on total oxidant and antioxidant status in brain of rats intoxicated with a direct acetylcholinesterase inhibitor. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2017), Bratislava, Slovakia, 10–13 September 2017. *Toxicology Letters*, Volume 280, Supplement 1, 2017, Page S90.
5. **Antonijević E**, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Curcic M, Bulat Z, Antonijević B. *In Vivo* Reactivating Efficacy of Oximes K203 and K027 Against a Direct Acetylcholinesterase Inhibitor: Dose-response Modeling. 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10), 12th Congress of the Serbian Society of Toxicology (12th SCT), Belgrade, Serbia, April 16-21 2018. Book of Abstracts:152. ISBN 978-86-917867-1-7
6. **Antonijević E**, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Curcic M, Bulat Z, Antonijević B. Reactivating efficacy of oximes K203 and K027 against a direct

acetylcholinesterase inhibitor in rat diaphragm: dose-response modeling. 13th International meeting on cholinesterases, 7th International conference on paraoxonases, University of Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic, September 9-14, 2018. Mil. Med. Sci. Lett. (Voj. Zdrav. Listy) 2018, 87 (supplementum 1), page 97.

5. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije su ukazali na bolji antidotski potencijal eksperimentalnog oksima K027 u odnosu na četiri standardna oksima, kao i njegovu bolju antidotsku efikasnost od eksperimentalnog oksima K203, na modelu OF pesticida dihlorvosu. Ovi rezultati podržavaju hipotezu o obećavajućoj hemijskoj strukturi oksima K027, vrednoj budućih *in vivo* ispitivanja kod strukturno različitih OF pesticida. Osim toga, ova doktorska disertacija dala je jedinstvene podatke o antioksidativnoj efikasnosti dva eksperimentalna K-oksima, ali i antioksidativnim potencijalima standardnih oksima, koji impliciraju da ovaj efekat oksima može doprineti ukupnom terapijskom ishodu kod trovanja OF/preveniranju stanja oksidativnog stresa koje se povezuje sa odloženim neurodegenerativnim poremećajima kod trovanja OF/njihovu *in vivo* redoks aktivnost.

Od posebnog značaja je ispitivanje dozne zavisnosti reaktivatorskih i antioksidativnih efekata K-oksima, koje je omogućilo kvantitativnu karakterizaciju ovih efekata, identifikaciju ekviefektivnih doza i robustno poređenje efikasnosti oksima K203 i K027. Kvanitifikacija ekviefektivnih doza oksimskih reaktivatora bi omogućila pouzdanije definisanje njihovih terapijskih širina, što dalje doprinosi boljem definisanju terapijskih doznih režima i konačno, povećava relevantnost rezultata dobijenih na animalnim modelima za ekstrapolaciju na ljude.

Verujemo da je ovim rezultatima učinjen jedan mali korak, u eksperimentalnom domenu ispitivanja, na putu ka razvoju oksimskih reaktivatora bolje efikasnosti i/ili šireg spektra dejstva u odnosu na postojeće oksime – specifične antidote kod trovanja OF jedinjenjima.

Imajući u vidu sve izneto, predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan izveštaj Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Evice Antonijević pod naslovom „Antidotska efikasnost novosintetisanih oksima K203 i K027 kod pacova akutno trovanih dihlorvosom“.

Komisija

Dr sc. Biljana Antonijević, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Danijela Đukić-Ćosić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Slavica Vučinić, redovni profesor
Univerzitet odbrane u Beogradu – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije