

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Evica Lj. Antonijević

**ANTIDOTSKA EFIKASNOST
NOVOSINTETISANIH OKSIMA K203 I K027 KOD
PACOVA AKUTNO TROVANIH DIHLORVOSOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Evica Lj. Antonijević

**ANTIDOTAL EFFICACY OF NEWLY
SYNTHESIZED OXIMES K203 AND K027 IN
RATS ACUTELY EXPOSED TO DICHLORVOS**

doctoral dissertation

Belgrade, 2019

Mentor:

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

Članovi komisije:

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

U Beogradu, _____

ANTIDOTSKA EFIKASNOST NOVOSINTETISANIH OKSIMA K203 I K027 KOD PACOVA AKUTNO TROVANIH DIHLORVOSOM

Sažetak

Standardna terapija akutnog trovanja ljudi organofosforim (OF) jedinjenjima sastoji se od leka sa antiholinergičkim efektom (atropin) i reaktivatora inhibirane acetilholinesteraze (AChE) (oksim). Međutim, eksperimentalne i kliničke studije pokazale su nezadovoljavajuću i/ili nejednaku efikasnost postojećih oksima kod strukturno različitih OF. Među eksperimentalnim oksimima po svojoj efikasnosti izdvojili su se oksimi K203 i K027, koji do sada nisu *in vivo* testirani na modelu pesticida.

Stoga je cilj istraživanja bio da se ispita njihova potencijalna terapijska i reaktivatorska efikasnost, kao i antioksidativni kapacitet kod pacova akutno trovanih dihlorvosom. U cilju poređenja, ispitivanja antidotske efikasnosti sprovedena su pod istim eksperimentalnim uslovima i sa standardnim oksimima. Najbolji antidotski efekat dobijen je nakon primene oksima K027. Efikasnost drugih ispitivanih oksima opadala je sledećim redosledom obidoksim>K203>trimedoksim>pralidoksim>azoksim. Oksim K027 je sam i u kombinaciji sa atropinom jedini doveo do značajne reaktivacije AChE eritrocita i dijafragme. Ekviektivne doze oksima K027 bile su niže od ekviektivnih doza oksima K203, dok je najniža doza oksima K027 bila potrebna za reaktivaciju AChE dijafragme. Analizom dozne zavisnosti antioksidativnog efekta dobijeno je da je oksim K203 značajno efikasniji u odnosu na oksim K027, pri čemu je najveća razlika u efikasnosti uočena za efekat smanjenja lipidne peroksidacije u plazmi, i za efekat smanjenja superoksidnog anjona u dijafragmi i mozgu.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na bolji antidotski potencijal oksima K027 u odnosu na oksim K203 što podržava hipotezu o obećavajućoj hemijskoj strukturi oksima K027, vrednoj budućih *in vivo* ispitivanja kod strukturno različitih OF pesticida.

Ključne reči: organofosfati, oksimi, atropin, akutno trovanje, acetilholinestaza, oksidativni stres, *Wistar* pacov, *benchmark* doza

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Toksikologija

ANTIDOTAL EFFICACY OF NEWLY SYNTHESIZED OXIMES K203 AND K027 IN RATS ACUTELY EXPOSED TO DICHLORVOS

Abstract

Standard therapy for acute human poisoning with organophosphorus (OP) compounds consists of anticholinergic drug (atropine) and reactivator of OP-inhibited acetylcholinesterase (AChE) (oxime). However, experimental and clinical studies have shown insufficient and/or unequal efficacy of current oximes against poisonings caused by structurally different OPs. Among the experimental oximes, oximes K203 and K027, have shown promising results, but they have not yet been tested *in vivo* using pesticide model. Therefore, the aim of the study was to examine their potential therapeutic and reactivating efficacy as well as antioxidant capacity in rats acutely poisoned with dichlorvos. For the sake of comparison, the study was also carried out with standardly used oximes under the same experimental protocol. The best antidotal effect was obtained after administration of oxime K027. The efficacy of other investigated oximes decreased in the following order: obidoxime>K203>trimedoxime>pralidoxime>asoxime. Oxime K027 alone and in combination with atropine led to a significant reactivation of erythrocyte and diaphragm AChE. The equieffective doses of oxime K027 were lower compared to oxime K203, while the lowest K027 dose was required for the reactivation of diaphragm AChE. Evaluation of dose-response relationship for antioxidant effect has shown that the oxime K203 was significantly more effective compared to K027, with the greatest difference in efficacy for the lipid peroxidation attenuation in plasma and reduction of superoxide anion radicals in the diaphragm and brain tissues.

The results of this doctoral dissertation indicate a better antidotal potential of oxime K027 compared to oxime K203, supporting the hypothesis on the promising chemical structure of oxime K027, worth of future *in vivo* testing with structurally different OP pesticides.

Key words: organophosphates, oximes, atropine, acute poisoning, acetylcholinesterase, oxidative stress, *Wistar* rat, *benchmark* dose

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Toxicology

SKRAĆENICE I AKRONIMI

2-PAM – pralidoksim

ACh – acetilholin

AChE – acetilholinesteraza

AOPP – uznapredovali produkti oksidacije proteina, engl. *advanced oxidation protein products*

BMD – benčmark doza, engl. *benchmark dose*

BMR – benčmark efekat, engl. *benchmark response*

BuChE – butirilholinesteraza

CED – doza kritičnog efekta, engl. *critical effect dose*

CES – veličina kritičnog efekta, engl. *critical effect size*

DDVP – dihlorvos

HI-6 – azoksim

i.m. – intramuskularno

LD₅₀ – srednja letalna doza

LüH-6 – obidoksim

MDA – malondialdehid

NA – nervni agensi

O₂^{·-} – superoksidni anjon

OF – organofosfati

OSI – indeks oksidativnog stresa

PAB – prooksidativno-antioksidativni balans

PON1 – paraoksonaza 1

PROAST – engl. *Possible Risk Obtained from Animal Studies*

RPF – faktor relativne potentnosti, engl. *relative potency factor*

s.c. – supkutano

-SH grupe – sulfhidrilne grupe

SOD – superoksid-dismutaza

TI – terapijski indeks

TMB-4 – trimedoksim

TOS – totalni oksidativni status

TAS – totalni antioksidativni status

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Toksikološki značaj organofosfornih jedinjenja	1
1.2. Mehanizam dejstva organofosfornih jedinjenja.....	2
1.3. Klinička slika trovanja organofosfornim jedinjenjima	3
1.4. Uloga oksidativnog stresa u toksičnosti organofosfornih jedinjenja.....	4
1.5. Terapija trovanja organofosfornim jedinjenjima	5
1.5.1. Atropin	5
1.5.2. Oksimi.....	6
1.5.3. Oksimi K203 i K027.....	14
2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3. MATERIJAL I METODE.....	16
3.1. Eksperimentalne životinje.....	16
3.2. Supstance i način davanja	17
3.3. Eksperimentalni dizajn i procedure.....	19
3.3.1. Ispitivanje akutne toksičnosti oksima.....	19
3.3.2. Ispitivanje terapijskog efekta oksima	19
3.3.3. Ispitivanje reaktivatorskog efekta oksima	19
3.3.3.1. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze u eritrocitima	20
3.3.3.2. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze u dijafragmi i mozgu.....	20
3.3.3.3. Određivanje aktivnosti butirilholinesteraze u plazmi	21
3.3.4. Ispitivanje antioksidativnog efekta oksima	21
3.3.4.1. Priprema homogenata tkiva.....	22
3.3.4.2. Određivanje biomarkera oksidativnog stresa.....	23
3.3.5. Ispitivanje dozne zavisnosti antidotskih efekata oksima K203 i K027.	27
3.4. Statistička obrada podataka.....	28
4. REZULTATI.....	31
4.1. Akutna toksičnost oksima.....	31
4.2. Terapijski potencijal oksima kod pacova trovanih dihlorvosom	32

4.3.	Reaktivatorski potencijal oksima kod pacova trovanih dihlorvosom	34
4.4.	Reaktivatorska efikasnost oksima K203 i K027 kod pacova trovanih dihlorvosom.....	37
4.4.1.	Model dozne zavisnosti efekta reaktivacije acetilholinesteraze eritrocita	37
4.4.2.	Model dozne zavisnosti efekta reaktivacije acetilholinesteraze dijafragme	48
4.4.3.	Model dozne zavisnosti efekta reaktivacije acetilholinesteraze mozga	59
4.4.4.	Model dozne zavisnosti efekta reaktivacije butirilholinesteraze plazme	70
4.5.	Antioksidativni potencijal oksima kod pacova trovanih dihlorvosom.....	78
4.5.1.	Efekat atropina i/ili oksima na redoks status u plazmi.....	78
4.5.2.	Efekat atropina i/ili oksima na redoks status u dijafragmi	86
4.5.3.	Efekat atropina i/ili oksima na redoks status u mozgu.....	94
4.6.	Antioksidativna efikasnost oksima K203 i K027 kod pacova trovanih dihlorvosom.....	102
4.6.1.	Modeli dozne zavisnosti antioksidativnih efekata atropina i/ili oksima u plazmi	102
4.6.2.	Modeli dozne zavisnosti antioksidativnih efekata atropina i/ili oksima u dijafragmi.....	112
4.6.3.	Modeli dozne zavisnosti antioksidativnih efekata atropina i/ili oksima u mozgu	123
5.	DISKUSIJA.....	133
5.1.	Terapijska i reaktivatorska efikasnost oksima	133
5.2.	Antioksidativna efikasnost oksima	148
6.	ZAKLJUČCI.....	155
7.	LITERATURA.....	157
	Biografija autora.....	177
	Izjava o autorstvu	178
	Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	179
	Izjava o korišćenju.....	180

1. UVOD

1.1. Toksikološki značaj organofosfornih jedinjenja

Organofosforna (OF) jedinjenja se upotrebljavaju kao pesticidi, a predstavnici sa visokom akutnom toksičnošću predstavljaju najtoksičniju grupu hemijskih agenasa koji su korišćeni kao nervni agensi (NA).

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) izloženost ljudi pesticidima se dovodi u vezu sa razvojem Parkinsonove bolesti (usled profesionalne i neprofesionalne izloženosti), limfoma/multiplih mijeloma i leukemije, depresije, a perinatalna izloženost i sa autizmom i poremećajima deficita pažnje kod dece (Prüss-Üstün i sar., 2016). Međutim, pesticidi predstavljaju značajan globalni rizik po ljudsko zdravlje kao uzročnici akutnih trovanja, i to prvenstveno samoubilačkih trovanja zbog lake dostupnosti, profesionalnih i slučajnih trovanja usled nekontrolisane i nepravilne upotrebe, uz nedoslednu primenu mera lične i kolektivne zaštite.

Samoubilačka trovanja pesticidima čine jednu trećinu svih suicida na svetskom nivou, koja odnose preko 800 000 života godišnje, i dešavaju se u nerazvijenim i zemljama u razvoju Afrike, Jugoistočne Azije, Centralne Amerike i Zapadnog Pacifika (Eddleston i Phillips, 2004; Mew i sar., 2017; Prüss-Üstün i sar., 2016).

Incidencija akutnih trovanja pesticidima usled profesionalne izloženosti je procenjena na 18,2 slučaja na 100 000 poljoprivrednih radnika godišnje u razvijenim zemljama, dok je u zemljama u razvoju, usled velikog broja faktora uticaja, incidencija mnogo veća (Thundiyil i sar., 2008).

Prema 17-to godišnjem iskustvu Nacionalnog centra za kontrolu trovanja (NCKT) R. Srbije, do 2014. godine, akutna trovanja OF pesticidima u našoj zemlji nisu bila česta, ali su beležena gotovo svake godine (Vucinic i sar., 2018). U tom periodu evidentirano je 410 slučajeva akutnog trovanja OF pesticidima, koji su hospitalizovani, od čega su 92% bila samoubilačka trovanja, a 8% slučajna ingestija ili inhalacija OF. Oko 45% otrovanih pacijenata imalo je treći i četvrti stepen težine

trovanja, koja se odnose na teška trovanja i trovanja sa letalnim ishodom. Najnoviji dostupni podaci o akutnim trovanjima pesticidima u godišnjim izveštajima NCKT iz 2015. i 2016. godine ne odstupaju značajno od prethodno navedenih vrednosti sa 22 i 26 hospitalizovanih pacijenata, redom. Bez obzira na generalno nisku učestalost, težina trovanja, moguće komplikacije i njihov uticaj na troškove i dužinu hospitalizacije pacijenata čine akutna trovanja ljudi OF pesticidima u našoj zemlji veoma značajnim.

Uprkos Ženevskom protokolu iz 1925. kojim je zabranjena primena nervnih agenasa, tabun i sarin su korišćeni tokom osamdesetih godina u ratu između Iraka i Irana (Balali-Mood i Balali-Mood, 2008). U Japanu su se tokom 1994-1995. godine dogodili teroristički napadi sarinom u mestu Matsumoto i podzemnoj železnici u Tokiju (Yanagisawa i sar., 2006). Najnovija Konvencija o hemijskom oružju iz 1997. godine, zabranjuje razvoj, proizvodnju, skladištenje i upotrebu hemijskog oružja. I pored toga sarin je upotrebljen u ratnim sukobima u Siriji 2013. godine (Dolgin, 2013), kao i 2017. godine (Rodriguez-Llanes i sar., 2018). Kim Jong-Nam, polubrat severnokorejskog diktatora Kim Jong-Una ubijen je pomoću nervnog agensa VX u februaru 2017. godine (Nakagawa i Tu, 2018), a u martu 2018. godine bivši ruski špijun Sergej Skripalj i njegova ćerka otrovani su u Salisburiju, Velika Britanija, nervnim agensom iz grupe „Novichok“ (Vale i sar., 2018). Svi ovi događaji pokazuju da nervni agensi nisu samo deo istorije, već su i dalje nužno u fokusu interesovanja stručne i naučne javnosti.

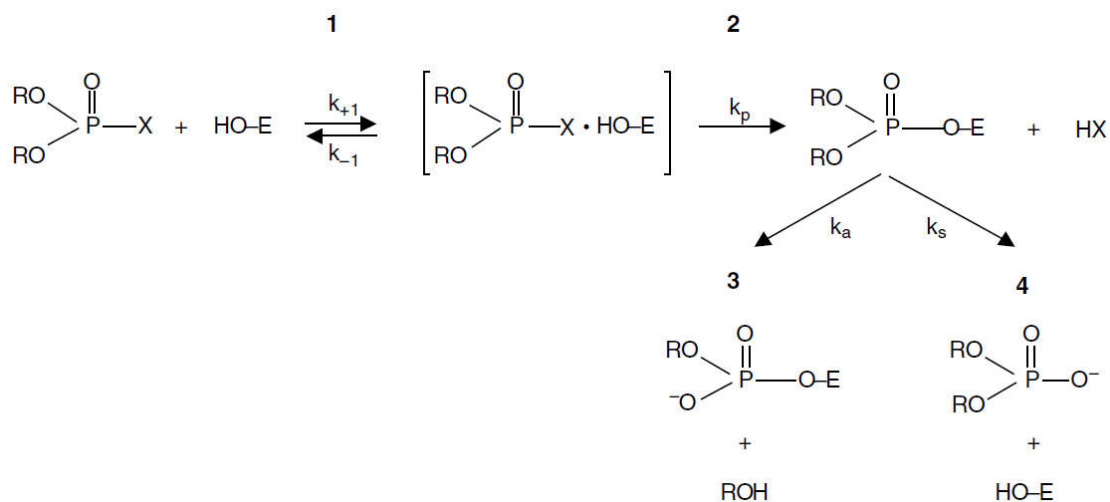
1.2. Mehanizam dejstva organofosfornih jedinjenja

Organofosfati inhibiraju sve enzime tipa serinskih hidrolaza, međutim kliničku sliku akutnog trovanja gotovo potpuno objašnjava inhibicija acetilholinesteraze (AChE, EC 3.1.1.7) (Slika 1) (Eyer, 2003; Maxwell i sar., 2006; Tougu, 2001).

Suptilne razlike u toksičnosti strukturno različitih OF mogu biti objašnjavane inhibicijom drugih serinskih hidrolaza, kao što su butirilholinesteraza (BuChE, EC 3.1.1.8), karboksilesteraza (EC 3.1.1.1), neurotoksična esteraza (ili esteraza povezana sa neuropatskim delovanjem, EC 3.1.1.5), kao i direktnim efektima OF na

holinergičke receptore (Casida i Quistad, 2004; Pope i sar., 2005). U procesu detoksikacije glavnu ulogu imaju fosfotriesteraze, kao što je paraoksonaza (PON1, EC 3.1.8.1), koje vrše hidrolizu molekula OF, ali detoksikaciji doprinose i karboksilesteraze, čijom fosforilacijom se smanjuje koncentracija slobodnih OF (Sogorb i Vilanova, 2010).

Aktivnost AChE predstavlja specifičan biomarker efekta OF i koristi se kod akutnih trovanja u dijagnostikovanju i proceni težine intoksikacije i monitoringu efekta oksimske terapije, kod hroničnih ekspozicija u proceduri procene rizika po zdravlje ljudi, dok aktivnost BuChE potvrđuje ekspoziciju, ali nema kliničkog značaja (Balali-Mood i Abdollahi, 2014).



Slika 1. Šematski prikaz inhibicije holinesteraze (E-OH) organofosfatom. Reakcija 1 predstavlja formiranje Michaelis-ovog kompleksa sa konstantom disocijacije ($K_d=k_{-1}/k_{+1}$), koja je obrnuto proporcionalna afinitetu OF ka enzimu. Reakcija 2 predstavlja fosforilaciju (k_p) hidroksilne grupe serinskog ostatka aktivnog centra enzima uz oslobađanje “odlazeće” grupe (HX). Reakcija 3 ilustruje spontanu dealkilaciju i formiranje stabilnog OF-E oksianjona, tzv. proces “starenja” (k_a). Reakcija 4 pokazuje spontanu reaktivaciju enzima (k_s) sa oslobađanjem neaktivnog kiselog organofosfata. Preuzeto i prilagođeno iz rada Eyer (2003).

1.3. Klinička slika trovanja organofosforim jedinjenjima

Organofosfati uzrokuju četiri neurotoksična sindroma kod ljudi: akutna holinergička kriza, intermedijarni sindrom, odložena periferna neuropatija i hronični OF-indukovani neuropsihijatrijski poremećaji (Eddleston i sar., 2008; Jokanović, 2018; Peter i sar., 2014). Ovi sindromi se razlikuju u vremenu koje

protekne od trenutka ekspozicije OF do razvoja simptoma i znaka, patogenezi, prognozi i tretmanu.

U kliničkoj slici akutne holinergičke krize, koja se razvija u roku od nekoliko minuta do 24 h od izlaganja OF, tradicionalno se razlikuju sledeći efekti hiperstimulacije holinergičkih receptora nagomilanim endogenim acetilholinom, čija fiziološka hidroliza izostaje usled inhibicije AChE organofosfatima:

- muskarinski – bradikardija i hipotenzija (srce, M2 receptori), zamagljeni vid i mioza (pupile, M2 i M3 receptori), rinoreja i bronhoreja (respiratorni), hipersalivacija i dijareja (gastrointestinalni), lakrimacija (okularni) i prekomerno znojenje (egzokrine žlezde, M2 i M3 receptori), bronhospazam, abdominalni bol, urinarna inkontinencija (glatki mišići, M2 i M3 receptori),
- nikotinski – slabost, fascikulacije, grčevi, paraliza mišića (neuromuskularna spojnica, N1 receptori); tahikardija i hipotenzija (autonomne ganglije, N2 receptori) i
- centralni efekti (M1-M5 receptori) – anksioznost i nemir, ataksija, konvulzije, insomnija, disartrijska, tremor, koma, respiratorna depresija, cirkulatorni kolaps.

Uzrok smrtnog ishoda kod trovanja ljudi OF je dominantno respiratorna insuficijencija, koja se razvija kao posledica nedostatka centralnog respiratornog “drajva”, paralize respiratornih mišića, pre svega dijafragme i hipoksije usled bronhoreje.

1.4. Uloga oksidativnog stresa u toksičnosti organofosfornih jedinjenja

Pored klinički najuočljivijeg mehanizma dejstva OF, eksperimentalne i kliničke studije, od prvih izveštaja 1970-tih godina (Jordanova E i sar., 1974; Pachecka i Królewska, 1977) do danas, daju dokaze da OF remete redoks procese u ćelijama putem iniciranja prekomernog oslobađanja reaktivnih slobodno radikalskih vrsta i/ili alteracijom endogenog antioksidativnog sistema, što doprinosi oštećenju ne samo neurona i mišića, već i drugih tkiva izloženog organizma (Abdollahi i sar., 2004; Karami-Mohajeri i Abdollahi, 2013; Lukaszewicz-

Hussain, 2010; Soltaninejad i Abdollahi, 2009). Takođe, studije na eksperimentalnim životinjama su pokazale da primena antioksidanasa, kao što su *N*-acetilcistein, vitamini E i C, melatonin, smanjuju nivoe biomarkera oksidativnog stresa u slučajevima akutne i ponavljane izloženosti OF, dokazujući ulogu oksidativnog stresa u OF intoksikacijama (Lukaszewicz-Hussain, 2010; Nurulain i sar., 2013).

1.5. Terapija trovanja organofosforim jedinjenjima

Uprkos tome što su OF dobro definisana grupa jedinjenja u pogledu strukture, čiji mehanizma dejstva i toksičnih efekata su dugo proučavani, terapija trovanja je predmet istraživanja i nakon 60 godina od prve kliničke primene specifičnog antidota – pralidoksima (Namba i sar., 1971, 1959; Namba i Hiraki, 1958). Nambin pionirski rad se zasnivao na dva ključna nalaza iz 1955. godine: primena atropina kao antimuskarinskog agensa doprinela je preživljavanju u slučajevima profesionalnog trovanja OF pesticidima (Freeman i Epstein, 1955) i razvoju pralidoksima, verovalo se moćnog reaktivatora AChE inhibirane OF (Wilson i Ginsburg, 1955). Nažalost, malo toga se promenilo od tada i pacijenti su i danas lečeni na sličan način, atropinom i malim brojem oksima (Eddleston i sar., 2004b; Johnson i sar., 2000; Thiermann i sar., 2013), te je polje istraživanja efikasnosti oksima još uvek otvoreno (Buckley i sar., 2011; Eyer, 2003; Worek i sar., 2016).

1.5.1. Atropin

Atropin (alkaloid biljaka iz familije *Solanaceae*) predstavlja kamen temeljac terapije trovanja OF još od 1950-tih (Durham i Hayes, 1962; Freeman i Epstein, 1955). Ovaj kompetitivni anatagonista muskarinskih receptora oslobađa muskarinskih efekata trovanja, pre svega bronhospazma, bronhoreje i bradikardije (sa hipotenzijom). Iako je opisan slučaj tretmana sa čak 30 g ukupne doze atropina date tokom pet nedelja (LeBlanc i sar., 1986), atropinizacija mora biti strogo kontrolisana zbog mogućeg dostizanja toksičnih efekata atropina (Aaron, 2001;

Abedin i sar., 2012; Connors i sar., 2014; Eddleston i sar., 2004a, 2004b; Heath i Meredith, 1992).

Nažalost, upotrebom atropina u terapiji trovanja OF postiže se samo delimičan uspeh. Atropin ne može osloboditi efekata nikotinske hiperstimulacije i popraviti neuromuskularnu disfunkciju, zbog čega je u slučajevima teških intoksikacija neophodno uključivanje mehaničke ventilacije. Takođe, atropin može samo delimično blokirati konvulzije, s obzirom da pri hiperholinergičkoj stimulaciji u mozgu dolazi do uključivanja i drugih neurotransmitera (npr. γ -aminobuterna kisellina, glutamat) (Antonijevic i Stojiljkovic, 2007; Zilker, 2005).

1.5.2. Oksimi

Oksimi su jedinjenja dizajnirana da reaktiviraju AChE inhibiranu OF (Wilson, 1951) i time omogućće fiziološku hidrolizu nagomilanog ACh u holinergičkim sinapsama. Dok je uloga atropina antagonizovanje samo muskarinskih efekata ACh, ključna uloga oksima u terapiji trovanja OF je da omogućće uspostavljanje normalne holinergičke transmisije, ne samo na muskarinskim, već i na nikotinskim receptorima u sinapsama. Stoga je očekivani klinički benefit oksima kod akutnih trovanja OF, oporavak funkcije respiratornih mišića, prvenstveno dijafragme i posledično smanjenje potrebe za mehaničkom ventilacijom, njenom dužinom trajanja i konačno smanjenje mortaliteta.

Do danas, svega nekoliko oksimskih reaktivatora je bilo korišćeno u terapiji trovanja ljudi OF i, interesantno, svi oni su sintetisani 50-tih i 60-tih godina prošlog veka. Godine 1955. dve grupe istraživača, jedna u Sjedinjenim Američkim Državama (Wilson i Ginsburg, 1955) i druga u Engleskoj (Childs i sar., 1955), su potpuno nezavisno pokazale visoku efikasnost monopiridinijskog oksima, pralidoksim jodida, u reaktivaciji inhibirane AChE. Pralidoksim je klinički prvi put upotrebljen već 1956. godine u Japanu kod trovanja parationom (Namba i Hiraki, 1958), i od tada je postao najšire korišćen oksim, dostupan u obliku različitih soli (hlorida, mesilata, metilsulfata i jodida) (Eyer i sar., 2008; Worek i Thiermann, 2013). Ubrzo su dalja istraživanja dovela do sinteza bispiridinijskih oksima. Trimedoksim je razvijen u Sjedinjenim Američkim Državama (Poziomek i sar., 1958), a danas nema podataka

o njegovoj upotrebi kod trovanja ljudi OF, međutim postoje podaci o farmakokinetici kod zdravih dobrovoljaca (Eyer i Worek, 2007; Vojvodic i Boskovic, 1976) i izostanku neželjenih efekata kod dece i odraslih slučajno otrovanih trimedoksimom iz auto-injektora u Izraelu (Bentur i sar., 2006; Kozer i sar., 2005). Obidoksim je razvijen i danas standardno korišćen u Nemačkoj, ali i drugim evropskim zemljama (Erdmann i Clarmann, 1963; Luettringhaus i Hagedorn, 1964; Worek i Thiermann, 2013). Azoksim (HI-6) je razvijen u Nemačkoj (Hagedorn i sar., 1969), korišćen je u terapiji trovanja ljudi OF pesticidima (Kusic i sar., 1991) i kod zdravih dobrovoljaca (Eyer i Worek, 2007), a danas je dostupan ili u fazi razvoja u obliku auto-injektora namenjenih za vojnu upotrebu u Kanadi, Švedskoj, Češkoj Republici i drugim zemljama (Antonijevic i Stojiljkovic, 2007; Lundy i sar., 2011).

Opsežne eksperimentalne studije, kao i ispitivanja kod ljudi (Kusic i sar., 1991; Thiermann i sar., 1997, 1999), dale su ubedljive dokaze da oksimi reaktiviraju OF-inhibiranu AChE. Međutim, postoje i mišljenja dve meta-analize randomizovanih kontrolisanih studija terapije akutnog trovanja ljudi OF pesticidima, dostupne prema našim najboljim saznanjima, o pitanju translacije biohemijskog efekta u klinički benefit, koje je prvi put postavljeno u opservacionoj studiji u Šri Lanki 1991. godine, kada je pokazano da deficit pralidoksima u periodu od šest meseci nije bio povezan sa lošijim ishodima terapije (Blumenberg i sar., 2018; Buckley i sar., 2011; de Silva i sar., 1992). Sistematičan pregled literature *Cochrane* kolaboracije iz 2011. godine identifikovao je sedam randomizovanih kontrolisanih studija (845 pacijenata): četiri iz Indije (Cherian i sar., 1997, 2005; Pawar i sar., 2006; Samuel i sar., 1996), jednu iz Šri Lanke (Eddleston i sar., 2009) i dve studije iz Kine (Huizhen i sar., 2008; Zhengyuan, 2006) (Buckley i sar., 2011). Sistematičan pregled literature iz 2018. godine u evaluaciju je uključio pet randomizovanih kontrolisanih studija (586 pacijenata): dve iz Indije (Cherian i sar., 1997, 2005) i studija iz Šri Lanke su preuzete iz prethodnog sistematskog pregleda i dodate su dve najnovije studije iz Indije (Banerjee i sar., 2011; Syed i sar., 2015) (Blumenberg i sar., 2018). U svim identifikovanim studijama u terapiji je korišćen pralidoksim, različitih doznih režima u obliku soli hlorida (osim u jednoj gde je korišćen jodid), uz atropin kao standard. Meta-analize rezultata ovih studija nisu pokazale značajnu razliku u mortalitetu, potrebi za mehaničkom ventilacijom i njenoj dužini trajanja između

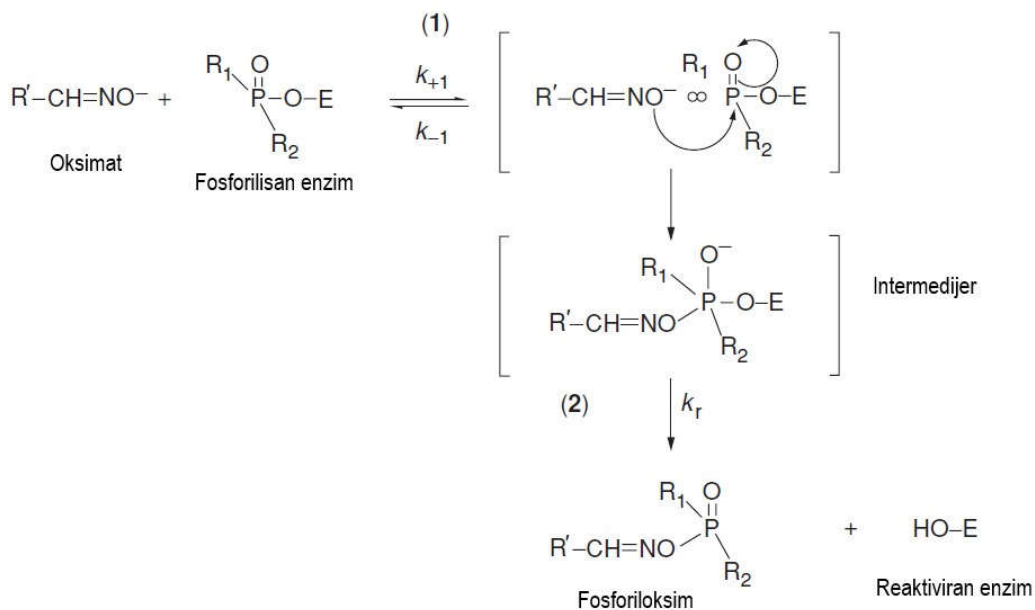
grupa tretiranih pralidoksimom i placebo, kao ni između grupa koje su primale “nižu” i “višu” dozu pralidoksima. Stoga je proistekao zaključak da trenutno nema dovoljno dokaza o kliničkom benefitu pralidoksima, ali, sa druge strane, ni riziku. Međutim, istovremeno su identifikovana mnoga ograničenja pojedinačnih studija, odnosno faktori koji su mogli uticati na rezultate analiza, i koji ne dozvoljavaju generalizaciju izvedenog zaključka: podaci potiču iz zemalja u razvoju, u kojima su prisutne velike varijacije u dostupnosti i opremljenosti jedinica intenzivne nege; neki identifikovani pesticidi su u tim zemljama komercijalno dostupni, dok je u visoko razvijenim zemljama njihova upotreba zabranjena ili strogo kontrolisana; neki pacijenti bili su otrovani karbamatnim pesticidima, čiju toksičnost oksimi mogu čak potencirati (Dawson, 1995, 1994; Harris i sar., 1989; Lieske i sar., 1992); deca nisu bila uključena, tako da ekstrapolacija rezultata na pedijatrijsku populaciju nije moguća; identifikovane su metodološke manjkavosti randomizacije i slepog (maskiranog) dizajna; doze i dužina trajanja davanja pralidoksima variraju među studijama; tip OF, vreme proteklo od intoksikacije do terapije, težina intoksikacije i komorbiditeti nisu bili poznati ili uzeti u razmatranje, i konačno, pralidoksim je jedini evaluiran oksim, tako da rezultati ne mogu da budu ekstrapolirani na druge oksime. Svi ovi identifikovani faktori jasno pokazuju potrebu za, kao i predmet budućih istraživanja oksimske terapije: ispitivanje različitih doza, naročito s obzirom da je pokazano da dozni režim pralidoksim hlorida preporučen od strane SZO (30 mg/kg bolus doza praćena infuzijom 8 mg/kg/h) nije doveo do poboljšanja ishoda trovanja; randomizacija bi trebalo da bude stratifikovana prema tipu OF, vremenu zbrinjavanja i težini intoksikacije; merenje *ex vivo* potencijala reaktivacije eritrocitne AChE, zbog uticaja procesa “starenja” na efikasnost oksima; ispitivanje efikasnosti drugih oksima.

Iako u literaturi postoje opservacione studije koje su pokazale poboljšanje kliničke slike samo-otrovanih pacijenata OF pesticidima nakon tretmana obidoksimom (Eyer i sar., 2009, 2003), do danas ne postoje kliničke studije koje pokazuju efikasnost.

Eksperimentalne studije su pokazale različitu reaktivatorsku aktivnost standardnih oksima prema strukturno različitim OF pesticidima i NBOt. Velike varijacije konstanti disocijacije ($1 - >2000 \mu\text{M}$) i konstanti reaktivacije ($\sim 0,01 - 3$

min⁻¹) oksima su pokazne *in vitro* studijama (Slika 2) (Eyer i Worek, 2007). U ovom smislu obidoksim pokazuje najveću reaktivatorsku potentnost prema fosforilisanom AChE eritrocita kod ljudi, dok AChE inhibirana fosforamidatima, kao što je tabun, ostaje imuna na napade standardnih oksima (Worek i sar., 2004). Ovo je, generalno posmatrano zbog heterogenosti dizajna, u saglasnosti sa nalazima eksperimenata kod animalnih modela, i opšte je prihvaćeno da su obidoksim i trimedoksim efikasniji kod OF pesticida, nasuprot široko korišćenom pralidoksimu (Antonijević i sar., 2005; Antonijević i Stojiljković, 2007; Jokanović i Maksimović, 1995), dok se trovanja tabunom i somanom za sada smatraju terapijskim izazovom. Obidoksim i pralidoksim su efikasni kod sarina i VX, ali neefikasni kod ciklosarina, kod koga je HI-6 pokazao zadovoljavajuću efikasnost. HI-6 je, za razliku od ostalih oksima, pokazao relativno dobru efikasnost kod somanu izloženih glodara, uprkos nalazima o velikoj brzini "starenja" AChE inhibirane ovim NBOt. Međutim pri potencijalnoj ekstrapolaciji rezultata na ljudsku populaciju treba imati u vidu značajnu varijaciju brzine "starenja" somanom inhibirane AChE između vrsta (1-2 minuta kod ljudi i drugih primata, 8-10 minuta kod glodara i oko 16 minuta kod kunića), koja je od manjeg značaja za druge NBOt (Eyer i Worek, 2007).

Pokazano je *in vitro* da su fosforiloksimi (engl. *phosphyloxime*, *POX*) i sami snažni fosforilišući agensi i u slučaju da su dovoljno stabilni mogu re-inhibirati reaktiviran enzim (Worek i Thiermann, 2013). Iako potentnost *POX* zavisi i od tipa fosfatnog dela molekule, generalno je pokazano da stabilne *POX* grade obidoksim i trimedoksim, kao 4-piridinijum aldoksimi, dok nestabilne grade 2-piridinijum aldoksimi, pralidoksim i HI-6. Formiranje *POX* može uticati na kinetiku reaktivacije *in vitro*, ali je relevantnost kod ljudi još uvek otvoreno pitanje (Eyer, 2003; Eyer i Worek, 2007).



Slika 2. Šematski prikaz reaktivacije fosforilisanog AChE oksimom u dve faze. U prvoj fazi (1) dolazi do nukleofilnog napada oksimnog anjona, oblika oksima pri fiziološkom pH, na atom fosfora, koji je vezan za serinski ostatak aktivnog centra enzima, pri čemu dolazi do formiranja intermedijernog (Michaelis-ovog) kompleksa. Konstanta disocijacije Michaelis-ovog kompleksa ($K_d=k_{-1}/k_{+1}$) je indirektno proporcionalna afinitetu oksima ka fosforilisanom enzimu. U drugoj fazi (2) dolazi do odlaska oksima sa fosforil grupom sa enzima i formiranja fosforiloksima i slobodnog enzima. Konstanta reaktivacije (k_r) pokazuje stopu uklanjanja fosforil grupe sa enzima. Konstanta stope efikasnosti oksima se dobija kao količnik k_r/K_d . Preuzeto i prilagođeno iz rada Eyer (2003).

Brzina i stepen reaktivacije određena je i brzinom spontane dealkilacije fosforilisanog enzima, tzv. procesa “starenja”, i formiranja oksianjona (Slika 1), koga više nije moguće reaktivirati. Međutim, pokazano je da je *in vivo* “starenje” obično sporije od onog određenog *in vitro* (Thiermann i sar., 1997) uz moguće objašnjenje da ACh akumuliran u sinapsama stupa u kompeticiju sa OF za aktivno mesto AChE, kao i da terapija oksimom održava određeni procenat AChE u aktivnom stanju i štiti je od “starenja” (Johnson i sar., 2000). Takođe, dovoljno dugo davanje oksimske terapije je neophodno zbog toga što OF, kao liposolubilne molekule, stvaraju depoe u masnom tkivu, iz kojih se mogu postepeno oslobađati u cirkulaciju i produžiti intoksikaciju (Eyer, 2003).

Oksimski reaktivatori su dizajnirani tako da odgovaraju aktivnom centru AChE i obezbede defosforilaciju, što implicira i moguću kompeticiju sa supstratom enzima. Pokazano je da je konstanta disocijacije oksima sa kompleksa enzim-

supstrat oko 10 puta veća od konstante disocijacije oksima sa enzima bez supstrata (Eyer i Worek, 2007). Akutna toksičnost oksima ispitivana je kod različitih *in vivo* modela i pri različitim načinima davanja i nije nađena velika razlika u osetljivosti malih oglednih životinja, a srednje letalne doze pri intravenskoj (*i.v.*) primeni su približno dva puta manje od onih pri intramuskularnoj (*i.m.*) (Marrs, 1991). Na osnovu vrednosti srednjih letalnih doza kod pacova, najveću *i.m.* toksičnost poseduje trimedoksim (~0,2 mmol/kg), zatim obidoksim, pa pralidoksim, dok je HI-6 najmanje toksičan (~2,2 mmol/kg) standardni oksim (Eyer i Worek, 2007). Postoje nalazi i o formiranju toksičnog cijanida pri *i.v.* davanju HI-6 (100 µM) kod pasa, ali je zaključeno da to ne mora predstavljati potencijalnu opasnost, s obzirom na to da svega 4% primenjene doze daje cijanid i da stopa eliminacije prevazilazi stopu formiranja (Eyer i sar., 1987). Toksičnost oksima predstavlja ograničavajući faktor za dostizanje njihove maksimalne terapijske koncentracije.

Pored gore pomenutih faktora koji utiču na reaktivatorsku efikasnost oksima, dodatno na njihovu *in vivo* terapijsku efikasnost utiču farmakokinetika oksima i toksikokinetika, uključujući (bio)perzistentnost OF. U ovom smislu posebno značajno mesto u istraživanjima predstavlja prolazak oksima kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) i efekat reaktivacije AChE u centralnom nervnom sistemu. Iako se zbog hidrofilnih osobina oksima, za razliku od lipofilnih OF, očekivala i eksperimentalno pokazala njihova niska penetracija, postoje i dokazi o većoj permeabilnosti KMB u prisustvu OF i određenom stepenu centralne reaktivacije koja je takođe značajna (Bajgar i sar., 2007; Eyer, 2003; Kalász i sar., 2015; Lorke i sar., 2008b).

Osim reaktivaciji inhibirane AChE, terpijski efekat oksima je pripisivan i tzv. "direktnim" efektima (van Helden i sar., 1996). *In vitro* studije dale su dokaze o interakciji oksima sa holinergičkim receptorima (Alkondon i sar., 1988; Amitai i sar., 1980; Kloog i Sokolovsky, 1985; Kuhnen-Clausen, 1972, 1970; Kuhnen-Clausen i sar., 1983; Tattersall, 1993). Ova hipoteza je potkrepljena eksperimentima na glodarima, gde značajan terapijski efekat oksima, prevnstveno HI-6, nije bio povezan sa reaktivacijom AChE (Busker i sar., 1991; Melchers i sar., 1991; van Helden i sar., 1991). Ipak, HI-6 nije uspeo da oporavi somanom blokiranu neuromuskularnu transmisiju na interkostalnom mišiću čoveka, čak pri supra-

terapijskim koncentracijama (Seeger i sar., 2011; Tattersall i sar., 1998). Stoga se za sada pretpostavlja da “direktni” efekti oksima mogu biti specifični za pojedine ogleadne vrste.

Najnovija istraživanja mehanizama dejstva oksima, uzimaju u obzir i nalaze da OF, pored inhibicije AChE, ometaju redoks procese u ćelijama, i pretpostavila su da antioksidativne osobine oksimskih reaktivatora mogu doprineti tretmanu intoksikacija OF. Osnov za ovu hipotezu bili su *in vitro* nalazi da 3-(fenilhidrazono)-butan-2-on oksim i butan-2,3-diontiosemikarbazon oksim značajno “hvataju” slobodne radikale (Puntel i sar., 2009, 2008). Takođe, butan-2,3-diontiosemikarbazon značajno je smanjio bazalnu i prooksidansima indukovanu lipidnu peroksidaciju u mozgu i jetri miševa *in vitro* i *ex vivo*, a istovremeno ne remeteći *ex vivo* bazalne nivoe tiola ni aktivnost dehidrataze δ -aminolevulinske kiseline u mozgu, jetri i bubregu miševa (Puntel i sar., 2009). Dodatno, ova dva oksima pokazala su antioksidativnu aktivnost pri *in vitro* Cu^{2+} -indukovanoj oksidaciji lipoproteina male gustine i seruma, na osnovu čega je po prvi put pretpostavljen antiaterogeni efekat oksima (de Lima Portella i sar., 2008). Veći antioksidativni kapacitet amido-karbonil oksima od sintetičkih antioksidanasa, kao što su butilovani hidroksianizol, butilovani hidroksitoluen i troloks, pokazan je *in vitro* (Özen i Taş, 2009). Do danas, svega nekoliko *in vivo* studija je ispitivalo sposobnost i efikasnost piridinijumskih oksima da neutrališu oksidativni stres indukovan različitim OF (Berend i sar., 2012; Aline P. da Silva i sar., 2008; dos Santos i sar., 2011; Pohanka i sar., 2009, 2011a). Može se očekivati da će slična ispitivanja u budućnosti zauzeti značajno mesto u istraživanjima oksimskih reaktivatora.

Eksperimentalne studije su pokazale kompleksnost farmako-toksikološkog profila oksima i veliki broj faktora uticaja efikasnosti odnosno ograničene efikasnosti standardnih oksima kod trovanja OF.

Nezadovoljavajuća efikasnost postojećih oksima je dovela do portage za efikasnijim oksimima, a njihova nejednaka efikasnost prema strukturno različitim OF i do portage za “univerzalnim” antidotom. Od vremena razvoja pralidoksima, trimedoksima, obidoksima i azoksima sintetisan je ogroman broj potencijalnih oksimskih reaktivatora (Gorecki i sar., 2017; Musilek i sar., 2007c; Petrova i Bielavsky, 2001). Istraživanja su provedena u Nemačkoj, gotovo isključivo u

laboratoriji prof. Ilse Hagedorn (Eyer, 2007), u SAD-u (Pang i sar., 2003), Holandiji (Benschop i sar., 1979), Izraelu (Amitai i sar., 1995), Hrvatskoj (Primožič i sar., 2004; Reiner i Simeon-Rudolf, 2006) i drugim zemljama. Jedinjenja novijeg datuma sintetisana su od strane istraživačkih grupa u Češkoj Republici (Kuca i sar., 2005; Musilek i sar., 2011a), SAD-u (Garcia i sar., 2010; Kalisiak i sar., 2011, 2012; Radic i sar., 2012; Sit i sar., 2011), Holandiji (de Koning i sar., 2011), Francuskoj (Mercey i sar., 2012), Južnoj Koreji (Oh i sar., 2008, 2006; Yang i sar., 2007) i Indiji (Acharya i sar., 2011b, 2011a). Fokus američkih, holandskih i francuskih istraživača je razvoj oksima sa boljom penetracijom kroz KMB kako bi se omogućila efikasnija reaktivacija AChE mozga. Dodatno, naponi istraživača usmereni su i na razvoj reaktivatora OF-inhibirane BuChE, kao pseudo-katalitičkog "hvatača" (engl. *scavenger*) OF (Kovarik i sar., 2010; Radic i sar., 2013). Takođe, izvesna istraživanja bavila su se razvojem ne-oksimskih reaktivatora i konjugovanih struktura oksima i atropina kao multifunkcionalnih jedinjenja (Bhattacharjee i sar., 2012; Lovrić i sar., 2011).

Otkriće kristalne strukture AChE, tek 1991. godine, pokrenulo je i *in silico* studije kvantitativnog odnosa strukture i dejstva (engl. *quantitative structure-activity relationship, QSAR*) u oblasti istraživanja reaktivatora i omogućilo dublje razumevanje katalitičke aktivnosti enzima, interakcije sa OF i oksimom i modelovanje struktura reaktivatora (Artursson i sar., 2009; Ashani i sar., 1995; Ekström i sar., 2009, 2006; Grosfeld i sar., 1996; Kovalevsky i sar., 2016; Sanson i sar., 2009; Sussman i sar., 1991; Wong i sar., 2000).

Idealan antidot bi trebalo da je efikasan u reaktivaciji inhibirane AChE, da ima širok spektar dejstva, dobru bioraspodivnost i nisku toksičnost, ali i odgovarajuću rastvorljivost i stabilnost.

Međutim, postavilo se pitanje evaluacije novih antidota (Worek i Thiermann, 2013). Heterogenost eksperimenatalnih protokola znatno otežava donošenje konzistentnih zaključaka. Većina jedinjenja je ispitivana samo *in vitro* i sa ograničenim brojem OF jedinjenja. Nema ispitivanja dozne zavisnosti efekata i poređenja efikasnosti ekvioletivnih doza oksimskih reaktivatora. Značajan aspekt je i veliki strukturalni i hemijski diverzitet OF jedinjenja i njihovih kompleksa sa

enzimom, koji dodatno komplikuje dizajn “univerzalnog” antidota. Iako je određeni progres napravljen, još uvek nije razvijen novi lek sa željenim karakteristikama.

1.5.3. Oksimi K203 i K027

U poslednjoj dekadi istraživanja češka grupa autora, na čelu sa prof. Kamil Kučom i prof. Kamil Musilekom, sintetisala je oko 300 potencijalnih reaktivatora OF inhibirane AChE, tzv. K-oksima (Gorecki i sar., 2017; Musilek i sar., 2011a). Među ovim eksperimentalnim oksimima po svojoj efikasnosti izdvojili su se oksim K203 ((*E*)-1-(4-karbamoilpiridinijum)-4-(4-hidroksiiminometilpiridinijum)-but-2-en dibromid) i K027 (1-(4-hidroksiiminometilpiridinijum)-3-(karbamoilpiridinijum)-propan dibromid), koji su primarno sintetisani i testirani protiv NBOt-ova (Kuča i sar., 2003a; Musilek i sar., 2007b). Oksim K203 se pokazao potentnim reaktivatorom AChE inhibirane tabunom *in vitro* i *in vivo* (Kassa i sar., 2008a; Musilek i sar., 2007b, 2007a; Musilek i sar., 2008a), kao i efikasnim u smanjenju letalnog ishoda kod miševa trovanih tabunom (Kassa i sar., 2008a; Kovarik i sar., 2009). U ovom pogledu oksim K027 je pokazao ograničen antidotski potencijal, ali je prevashodno pokazao dobar reaktivatorski potencijal u odnosu na AChE inhibiranu OF pesticidima *in vitro* (Kuča i sar., 2010). Dodatno, ovi oksimi su pokazali nisku akutnu toksičnost kod glodara (Čalić i sar., 2006; Kassa i sar., 2008a, 2009a, 2010; Lorke i sar., 2008c; Musilek i sar., 2007b), što je od značaja naročito u situacijama potrebe za primenom relativno visokih kumulativnih doza. Do sada međutim, nisu spovedena *in vivo* ispitivanja njihove efikasnosti na modelu pesticida. Zbog toga postoji potreba da se ispita efikasnost oksima K203 i K027 i kod akutnog trovanja organofosfatima koji su strukturno različiti u odnosu na NBOt.

Analizom dosadašnjih rezultata istraživanja može se pretpostaviti da oksimi K203 i K027 jesu obećavajući kandidati za dalja eksperimentalna ispitivanja koja bi imala za cilj da se utvrdi njihova veća efikasnosti i/ili širi spektar dejstva.

2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Na osnovu rezultata prethodnih istraživanja prepostavili smo da će oksim K027 pokazati bolju *in vivo* terapijsku i reaktivatorsku efikasnost od oksima K203 na modelu OF pesticida, kao i u poređenju sa oksimima standardno korišćenim u eksperimentalnoj i kliničkoj praksi. Pored inhibicije acetilholinestrase, kao specifičnog mehanizma toksičnog dejstva u ciljnim tkivima, prepostavili smo da OF dodatno dovode do stanja oksidativnog stresa, te da, primena oksima može obezbediti korekciju nastalog oksidativnog stresa.

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 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
- ispitati značaj i stepen povezanosti navedenih efekata oksima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su izvođeni na laboratorijskim pacovima (*Rattus norvegicus*) soja *Wistar*, muškog pola, nabavljenim na farmi za uzgoj eksperimentalnih životinja Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Tokom perioda aklimatizacije od najmanje sedam dana životinje su negovane u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Životinje su držane u polikarbonatnim kavezima sa žičanim poklopcem (dimenzija 425×266×185 mm, Techniplast, Italija), najviše po pet randomno selektovanih životinja u jednom kavezu, pri sobnoj temperaturi 22 ± 2 °C, relativnoj vlažnosti $55 \pm 10\%$ i dnevno/noćnom ciklusu od 12 h (osvetljenje od 6 do 18 h). Životinje su sve vreme imale pristup hrani (potpuna smeša za ishranu laboratorijskog pacova sa 20% proteina, Veterinarski zavod Subotica) i vodi (sa česme) *ad libitum*. Životinje su identifikovane pojedinačno označavanjem rednog broja pacova markerom po repu. Negovanje životinja i tretmani sprovedeni su tokom svetle faze dnevno/noćnog ciklusa. Eksperimentalne procedure su izvedene na životinjama starosti osam nedelja, telesne težine 180-200 g. Životinje su randomno opredeljene kontrolnoj grupi odnosno eksperimentalnim tretmanima. 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) i Pravilnikom o uslovima za upis u registar za oglede na životinjama i sadržini i načinu vođenja tog registra, programu obuke o dobrobiti oglednih životinja, obrascu zahteva za odobrenje sprovođenja oglada na životinjama, načinu nege, postupanja i lišavanja života oglednih životinja, kao i o sadržini i načinu vođenja evidencije o držanju, reprodukciji, prometu, odnosno sprovođenju oglada na životinjama („Sl. Glasnik R. Srbije“, broj 41/10).

3.2. Supstance i način davanja

Dihlorvos (DDVP) je dobijen na poklon od Chemical Agrosava d.o.o. (Beograd, Srbija) i bio je čistoće 98,8%.

Oksimi su sintetisani u saradničkoj laboratoriji profesora *Kamil Kuča-e* i *Kamil Musilek-a*, *Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Kralove*, Češka Republika. Čistoća korišćenih oksima je analizirana tehnikom visoko-efikasne tečne hromatografije i iznosila je >98%. Oksimi su čuvani na -20 °C.

Atropin-sulfat je nabavljen iz komercijalnih izvora (Sigma Chemical Company, SAD).

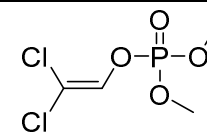
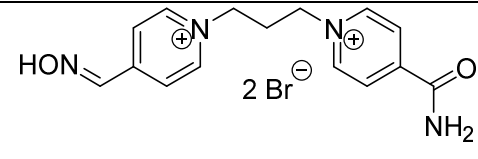
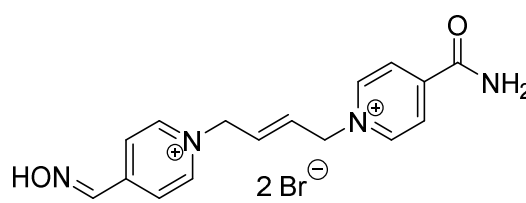
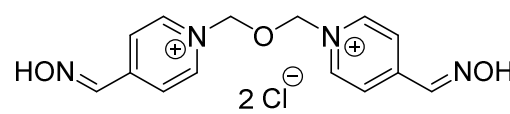
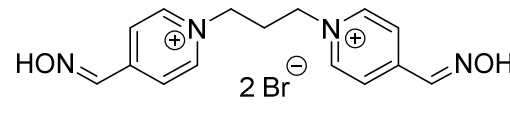
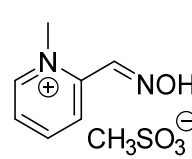
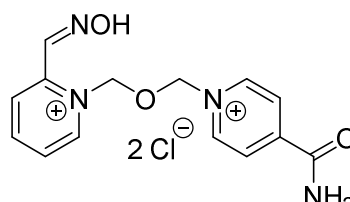
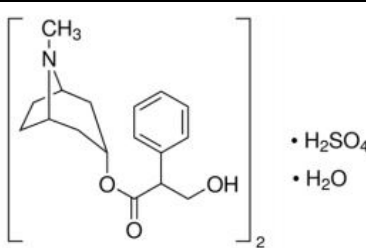
Sve ostale korišćene hemikalije i reagensi analitičkog stepena čistoće nabavljeni su iz komercijalnih izvora.

Strukturne formule, hemijska imena i molekulske mase ispitivanih supstanci prikazani su u Tabeli 1.

Osnovni rastvor DDVP-a izrađen je u izopropanolu (p.a, Centrohém, Srbija) i dalje razblaživan destilovanom vodom do željene koncentracije *ex tempore*. Oksimi i atropin-sulfat su rastvarani u destilovanoj vodi i razblaživani do željenih koncentracija *ex tempore*. Sve ispitivane supstance su davane životinjama u zapremini 1 mL/kg.

Rastvor DDVP-a je davan supkutano (*s.c*), dok su rastvor oksima i rastvor atropin-sulfata davani intramuskularno (*i.m*).

Tabela 1. Strukturne formule, hemijska imena i molekulske mase organofosfata dihlorvosu i ispitivanih oksima

Strukturna formula	Hemijsko ime	Molekulska masa (g/mol)
	Dihlorvos (DDVP) 0,0-dimetil-0-2,2-dihlorovinilfosfat	220,98
	K027 1-(4-hidroksiiminometilpiridinijum)-3-(4-karbamoilpiridinijum)-propan dibromid	446,14
	K203 (E)-1-(4-karbamoilpiridinijum)-4-(4-hidroksiiminometilpiridinijum)-but-2-en dibromid	458,15
	Obidoksim (LüH-6) 1,1'- oksidimetilen-bis-(4-hidroksiiminometilpiridinijum) dihlorid	359,21
	Trimedoksim (TMB-4) 1, 3-bis (4-hidroksiiminometilpiridinijum)-propan dibromid	443,98
	Pralidoksim (2-PAM) 2-((hidroksiimino)-metil)-1-metilpiridinijum mesilat	232,26
	Azoksim (HI-6) 1-(2-hidroksiiminometilpiridinijum)-3-(4-karbamoilpiridinijum)-2-oksapropan dihlorid monohidrat	377,22
	Atropin-sulfat (8-metil-8-azabiciklo(3.2.1)okt-3-il) 3-hidroksi-2-fenilpropanoat sulfat monohidrat	676,80

3.3. Eksperimentalni dizajn i procedure

3.3.1. Ispitivanje akutne toksičnosti oksima

Četiri do šest grupa eksperimentalnih životinja (5-8 pacova po grupi) tretirane su rastućim dozama oksima *i.m.* ili DDVP-a *s.c.* Na osnovu broja uginulih životinja u toku 24 h od tretmana u svakoj grupi i primenjenih doza, po metodi Litchfielda i Wilcoxon (1949) (Litchfield i Wilcoxon, 1949), izračunate su srednje letalne doze (LD₅₀) sa 95% - nim granicama pouzdanosti.

3.3.2. Ispitivanje terapijskog efekta oksima

Četiri do šest grupa eksperimentalnih životinja (5-8 pacova po grupi) tretirane su oksimom *i.m.* u dozi 5% LD₅₀ (oksim K203 35,6 μmol/kg, oksim K027 126,3 μmol/kg; obidoksim 24,3 μmol/kg; trimedoksim 25,6 μmol/kg; pralidoksim 61,8 μmol/kg; azoksim 105,9 μmol/kg) i/ili atropinom *i.m.* u dozi 10 mg/kg, neposredno nakon tretmana rastućim dozama DDVP-a (*s.c.*). Na osnovu broja uginulih životinja u toku 24 h od tretmana u svakoj grupi i primenjenih doza DDVP-a, po metodi Litchfielda i Wilcoxon (1949), izračunate su srednje letalne doze (LD₅₀) DDVP-a u prisustvu antidota sa 95% - nim granicama pouzdanosti. Efikasnost antidota je izražena kao terapijski indeks (TI), koji je izračunat prema sledećoj formuli: $TI_{\text{antidota}} = LD_{50}(\text{DDVP} + \text{antidot}) / LD_{50}(\text{DDVP})$.

3.3.3. Ispitivanje reaktivatorskog efekta oksima

Grupe eksperimentalnih životinja (5 pacova po grupi) tretirane su oksimom *i.m.* u dozi 5% LD₅₀ (oksim K203 35,6 μmol/kg, oksim K027 126,3 μmol/kg; obidoksim 24,3 μmol/kg; trimedoksim 25,6 μmol/kg; pralidoksim 61,8 μmol/kg; azoksim 105,9 μmol/kg) i/ili atropinom *i.m.* u dozi 10 mg/kg, neposredno nakon davanja DDVP-a *s.c.* u dozi 75% LD₅₀. Dodatno, kontrolna grupa životinja (5 pacova u grupi) nije bila tretirana, dok je jedna grupa životinja (5 pacova u grupi) tretirana samo DDVP-om na isti način kao i grupe sa antidotskim tretmanom. Tretmani su izvođeni između 8 i 9 h ujutru. Životinje su humano eutanazirane 60 minuta nakon

tretmana ugljen-dioksidom. Sakupljani su sledeći uzorci: krv, celi mozgovi i mišićni deo dijafragme. Pojedinačni uzorci su analizirani odmah nakon sakupljanja u cilju određivanja aktivnosti acetilholinesteraze (AChE), dok su delovi tkiva, kao i uzorci prethodno odvojene plazme neposredno po uzorkovanju zamrzavani u tečnom azotu, a potom, istog dana, prebačeni i čuvani na -80 °C (Evosafe VF 120-86E, Snijders, Holandija) do daljih analiza butirilholinesteraze i biomarkera oksidativnog stresa.

3.3.3.1. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze u eritrocitima

Krv je vađena intrakardijalnom punkcijom i sakupljena u hepariniziranim epruvetama. Uzorci krvi su centrifugirani 3000 xg tokom 15 minuta, nakon čega su eritrociti odvojeni od plazme. Eritrociti su ispirani tri puta u fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl) i hemolizovani u destilovanoj vodi u odnosu 1:600 (v/v). Aktivnost AChE je određivana spektrofotometrijski (Ellman i sar., 1961). U 1mL hemolizata eritrocita dodavano je 0,8 mL fosfatnog pufera pH 7,4 i 0,1 mL indikatora 5,5'-ditiobis-(2-nitro-benzoeva kiselina) (DTNB, Sigma-Aldrich, 99%, osnovni rastvor je sadržao 19,82 mg DTNB, 10 mg natrijum-hidrogenkarbonata i 1 mL etanola u 10 mL destilovane vode). Smeša je inkubirana 1 minut na 25 °C. Po dodatku 0,1 mL substrata acetiltioholin jodida (ACShJ, Acros Organics, 98%) krajnje koncentracije 1,75 mM (osnovni rastvor 35 mM), merena je promena apsorbancije na 412 nm koristeći Cary60 UV- VIS spektrofotometar uz Cary single cell Peltier, dodatak za temperaturno kontrolisana merenja (Agilent Technologies, SAD). Aktivnost enzima je izračunata po formuli:

$$\Delta A / \text{min} \times (\xi \times l)^{-1} \times V_{\text{uk}} \times V_{\text{uz}}^{-1} \times \text{razblaženje} = \text{aktivnost } [\mu\text{mol hidrolizovanog acetiltioholin jodida/min po mL eritrocita}]$$

gde je ξ molarni apsorpcioni koeficijent (1,36 mL/ $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$), l dužina optičkog puta (1 cm), V_{uk} ukupna zapremina reakcione smeše i V_{uz} zapremina uzorka.

3.3.3.2. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze u dijafragmi i mozgu

Uzorci dijafragme i mozga homogenizovani su u fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl) u odnosu 1:19 i 1:3 (m/v), redom, koristeći homogenizator T10 basic ULTRA-

TURRAX (IKA, Nemačka). Aktivnost AChE u homogenatima dijafragme i mozga je određivana spektrofotometrijski (Ellman i sar., 1961; Wilhelm, 1968). U 2,5 mL DTNB-a (osnovni rastvor je sadržao 74,4 mg u 10 mL fosfatnog pufera pH 7,4, a radni je dobijen razblaživanjem osnovnog u fosfatnom puferu u odnosu 1:50) je dodavano 0,02 mL homogenata mozga, ili u 2,3 mL DTNB-a je dodavano 0,2 mL homogenata dijafragme. Smeša je inkubirana 5 minuta na 25 °C. Po dodatku 20 µl supstrata acetiltioholin jodida (ACShJ, Acros Organics, 98%) krajnje koncentracije 1 mM (osnovni rastvor 135 mM), merena je promena absorbancije na 410 nm koristeći Cary60 UV-VIS spektrofotometar uz Cary single cell Peltier, dodatak za temperaturno kontrolisana merenja (Agilent Technologies, SAD). Aktivnost enzima je izračunata po formuli:

$$\Delta A/\text{min} \times (\xi \times l)^{-1} \times V_{\text{uk}} \times V_{\text{uz}}^{-1} \times \text{razblaženje} = \text{aktivnost } [\mu\text{mol hidrolizovanog acetiltioholin jodida}/\text{min po g tkiva}]$$

gde je ξ molarni apsorpcioni koeficijent (1,36 mL/µmol·cm), l dužina optičkog puta (1 cm), V_{uk} ukupna zapremina reakcione smeše i V_{uz} zapremina uzorka.

3.3.3.3. Određivanje aktivnosti butirilholinesteraze u plazmi

Aktivnost butirilholinesteraze u uzorcima plazme određena je korišćenjem komercijalno dostupnog reagensa za određivanje holinesteraza (COD 11589, BioSystems S.A., Španija) sa butiriltioholinom kao supstratom prema uputstvu proizvođača. Promena apsorbcije tokom vremena merena je na 405 nm na analizatoru ILAB 300 Plus (Instrumentation Laboratory, Milano, Italija). Aktivnost enzima je izračunata po formuli:

$$\Delta A/\text{min} \times (\xi \times l)^{-1} \times V_{\text{uk}} \times V_{\text{uz}}^{-1} \times 10^6 = \text{aktivnost } [\text{U}/\text{L plazme}]$$

gde je ξ molarni apsorpcioni koeficijent na 405 nm 927, l dužina optičkog puta (1 cm), V_{uk} ukupna zapremina reakcione smeše i V_{uz} zapremina uzorka, a 1U = 1 µmol hidrolizovanog supstrata/min.

3.3.4. Ispitivanje antioksidativnog efekta oksima

Istim eksperimentalnim dizajnom kao za ispitivanje reaktivatorskog efekta oksima ispitan je antioksidativni potencijal atropina i/ili oksima u uzorcima plazme,

dijafragme i mozga. U tom cilju određeni su sledeći biomarkeri oksidativno-antioksidativnog statusa: prooksidativni biomarkeri – superoksidni anjon ($O_2^{\cdot -}$) i totalni oksidativni status (TOS); enzimski i neenzimski antioksidativni biomarkeri – aktivnost enzima superoksid dismutase (SOD), ukupne sulfhidrilne grupe ($-SH$), totalni antioksidativni status (TAS) i aktivnost enzima paraoksonaze (PON), kao i pokazatelji opterećenja tkiva oksidativnim stresom – prooksidativno oksidativni balans (PAB) i indeks oksidativnog stresa (OSI). Dodatno, kao mera oksidativnog oštećenja tkiva određeni su malondialdehid (MDA), proizvod procesa lipidne peroksidacije i uznapređovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP).

Svi korišćeni reagensi analitičkog stepena čistoće bili su nabavljeni iz komercijalnih izvora. Spektrofotometrijske metode za određivanje $O_2^{\cdot -}$, TAS, TOS, $-SH$, SOD, PON, AOPP su prilagođene i implementirane na analizatoru ILAB 300 Plus analyzer (Instrumentation Laboratory, Italija) (Kotur-Stevuljevic i sar., 2015, 2008). Spektrofotometrijsko merenje MDA i proteina u *crude* homogenatu, kao i proteina u plazmi izvedeno je na spektrofotometru Cary60 UV-VIS (Agilent Technologies, SAD). Metoda određivanja PAB-a je izvedena na ELISA ploči, a merenje na ELISA čitaču (Pharmacia LKB, Austrija).

3.3.4.1. Priprema homogenata tkiva

Nakon nepotpunog odmrzavanja, brzim postupkom na ledu ($0 - 4\text{ }^{\circ}C$), priprema tkiva dijafragme i mozga za analize vršena je homogenizacijom 0,2 - 0,4 g uzorka u hladnom fosfatnom puferu (0,1 M, pH 7,4, koji sadrži 1,15% KCl) u odnosu 1:9 (v/v) koristeći homogenizator T10 basic ULTRA-TURRAX (IKA, Nemačka) (Pawa i Ali, 2004). Deo homogenata je odvojen u ependorf tube i korišćen za određivanje MDA. Ostatak homogenata je podvrgnut diferencijalnom centrifugiranju na $+4\text{ }^{\circ}C$ i to prvo na 800 xg tokom 10 minuta, a zatim na 9500 xg tokom 20 minuta čime je dobijen postmitohondrijalni supernatant. Postmitohondrijalni supernatant je odvajanje u ependorf tube i korišćen za određivanje svih ostalih biomarkera oksidativnog stresa.

3.3.4.2. Određivanje biomarkera oksidativnog stresa

3.3.4.2.1. Određivanje superoksidnog anjona

Za određivanje superoksidnog anjona ($O_2^{\cdot -}$) primenjena je metoda po (Auclair i Voisin, 1985), gde $O_2^{\cdot -}$ redukuje nitro grupu aromatičnog jedinjenja nitroblue-tetrazolijuma (NBT, 2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difenilen)-ditetrazolijum hlorid) do mono- i diformazana. Diformazan koji nastaje potpunom redukcijom NBT-a, je nerastvorljiv u vodi i zbog toga je neophodno dodati želatin (0,1 mg/mL), koji održava diformazan u rastvornom obliku u 1 mM NBT-u. Da bi redukcija NBT-a do diformazana bila potpuna i odgovarajuća za merenje, neophodno je inhibirati spontanu dismutaciju kiseonika koja kompetira reakciji redukcije NBT-a. To se postiže smanjenjem pritiska kiseonika u medijumu, a kroz uvođenje azota pod pritiskom u trajanju od 1 h u NBT reagens. Reakcioni medijum činio je 0,05 M fosfatni pufer pH 8,6 (uz 0,1 mM EDTA). Brzina promene boje žutog NBT-a u plavi formazan predstavlja nivo stvaranja $O_2^{\cdot -}$ i meri se spektrofotometrijski na 550 nm. Koncentracija se izražava u jedinicama μmol redukovano NBT /min/L.

3.3.4.2.2. Određivanje totalnog oksidativnog statusa

Totalni oksidativni status (TOS) određen je metodom po Erel-u (2005), koja se zasniva na principu da ukupni oksidansi, kao što su vodonik-peroksid i lipidni hidroperoksidi, oksiduju fero jon-ortodianizidin kompleks u feri jon. Reagens se sastojao od 5 mM feroamonijum sulfata i 10 mM o-dianizidin dihidrohlorida. Reakcija oksidacije je olakšana glicerolom (1,35 M) u reakcionom medijumu. U drugoj fazi reakcije nastali feri jon reaguje sa ksilenol-oranžom (150 μM) u kiseloj sredini pri čemu nastaje obojeni kompleks koji se meri spektrofotometrijski na 560 nm. Kao standard korišćen je vodeni rastvor vodonik-peroksida u opsegu koncentracija od 10 do 200 μM . Koncentracija se izražava u jedinicama $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L.

3.3.4.2.3. Određivanje totalnog antioksidativnog statusa

Totalni antioksidativni status (TAS) određen je metodom po Erel 2004, koja koristi kao hromogen 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolidin)-6-sulfonat (ABTS). Redukovan ABTS (10 mM) se najpre oksiduje do obojenog ABTS⁺ katjona uz vodonik-peroksid (2 mM) u kiselom medijumu (acetatni pufer, 30 mM, pH 3,6). U prisustvu antioksidanasa u uzorku obojeni ABTS⁺ katjon se redukuje do bezbojnog ABTS-a što se manifestuje smanjenjem intenziteta boje ABTS rastvora na 660 nm. Intenzitet boje obrnuto je srazmeran koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u uzorku. Kao standard korišćen je hidrosolubilni analog vitamina E – *Trolox* (6 – hidroksi - 2,5,7,8 - tetrametilhroman - 2 - karboksilna kiselina), rastvoren u fosfatnom puferu (30 mM, pH 7,4). Koncentracija se izražava u jedinicama $\mu\text{mol Trolox Equiv/L}$.

3.3.4.2.4. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze

Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1) određena je po metodi (Misra i Fridovich, 1972), koja se zasniva na sposobnosti enzima da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini (karbonatni pufer 0,05 mM, pH 10,2) na 25 °C. Aktivnost SOD-a se dobija merenjem apsorpcije nastalog crvenog proizvoda oksidacije adrenalina na 480 nm, bez prisustva SOD (kontrola) i u prisustvu SOD (analiza). Koncentracija adrenalina (osnovni rastvor: 10 mM u 15 mM HCl) je razblaživana 15 mM HCl do koncentracije koja je dala u kontroli promenu apsorpcije 0,025 U/min, jer je utvrđeno da SOD tada postiže najveći procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Jedna jedinica aktivnosti SOD (U) se definiše kao aktivnost enzima koja izaziva 50% inhibicije autooksidacije adrenalina. Aktivnost SOD se izražava kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u jedinicama U/L.

3.3.4.2.5. Određivanje ukupnih sulfhidrilnih grupa

Ukupne sulfhidrilne grupe (-SH) određene su metodom po (Ellman, 1959) u kojoj alifatični tioli u baznoj sredini (0,2 M K₂HPO₄, 2 mM EDTA, pH 9,0) reaguju sa 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoevom kiselinom (DTNB, 10 mM u 50 mM fosfatnom

puferu, pH 7,0) pri čemu nastaje obojeni p-nitrofenol, koji se određuje spektrofotometrijski na 412 nm. Jedan mol tiola daje jedan mol p-nitrofenola.

3.3.4.2.6. Određivanje aktivnosti paraoksonaze u plazmi

Aktivnost paraoksonaze (PON1, EC 3.1.8.1) je određena metodom po Richter-u i sar. (1999), koja se zasniva na delovanju enzima na supstrat paraokson (1,2 mM, Chem Service, SAD) u baznom medijumu (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 2 mM CaCl₂) na 25 °C, pri čemu nastaje p-nitrofenol, čija absorbancija se meri na 405 nm. Aktivnost se izražava u jedinicama μmol stvorenog p-nitrofenola/min/L.

3.3.4.2.7. Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa u plazmi

Prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) određen je po modifikovanoj metodi (Alamdari i sar., 2007). Hromogen 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin (TMB, 0.6% u dimetilsulfoksidu) reaguje istovremeno i sa prooksidansima (H₂O₂) i sa antioksidansima (mokraćnom kiselinom) prisutnim u uzorku. Enzim peroksidaza katalizuje reakciju H₂O₂ i hromogena kada nastaje oksidovani TMB kao plavo obojeni proizvod. Reakcija mokraćne kiseline i hromogena nije enzimski katalizovana i tada se TMB redukuje do bezbojnog proizvoda. Neto reakcija predstavlja upravo razliku dva suprotna oksido-redukciona procesa na istom hromogenu, a intenzitet obojenja odgovara koncentraciji H₂O₂ u antioksidativnom okruženju. Kalibracija reakcije se izvodi sa standardnim rastvorima, izrađenim sa rastvorima H₂O₂ (1mM) i mokraćne kiseline (6 mM in 10 mM NaOH) u različitim odnosima (0-100%). Apsorbancija na 450 nm je srazmerna ravnoteži između prisutnih oksidanasa i antioksidanasa. Vrednosti PAB-a se izražavaju u arbitrarnim jedinicama – HKU (vodonik-peroksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat H₂O₂ u standardnim rastvorima.

3.3.4.2.8. Određivanje koncentracije malondialdehida

Malondialdehid (MDA) je određen metodom po (Girotti i sar., 1991), koja se zasniva na tome da krajnji proizvodi lipidne peroksidacije mogu da reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i obrazuju crveno-obojeni kompleks. Nakon

inkubacije smeše uzorka i TBA-reagensa (15% trihlorsirćenta kiselina, 0,375% tiobarbiturna kiselina i 0,25 M HCl) na 100 °C tokom 5 minuta, hlađenja na ledu i centrifugiranja pri 10 000 xg tokom 10 minuta na +4 °C, apsorbancija je merena na 535 nm. Koncentracija se izražava u jedinicama µmol/L.

3.3.4.2.9. Određivanje koncentracije uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina

Uznapredovali proizvodi oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP) određeni su metodom po (Witko-Sarsat i sar., 1996). Spektralnom analizom razblaženog uzorka fosfatnim puferom (20 mM, pH 7,4) u opsegu talasnih dužina 200-400 nm uočava se karakterističan pik oko 340 nm. Dodavanjem glacijalne sirćetne kiselina i kalijum jodida (1,16M) dolazi do promene apsorbancije koja se meri na 340 nm. Koncentracija AOPP se izražava preko ekvivalenata hloramina T koji se koristi za izradu standardne krive (10-100 µmol/L), pri čemu njegova apsorbancija linearno raste sa porastom koncentracija. Jedinice izražavanja AOPP su µmol/L ekvivalenata Hloramina T.

3.3.4.2.10. Određivanje koncentracije proteina u dijafragmi i mozgu

Proteini su određivani metodom po (Bradford, 1976), koja se zasniva na vezivanju boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za molekul proteina u uzorku, pri čemu dolazi do pomeranja apsorpcionog maksimuma boje sa 465 na 595 nm. Kao standard korišćen je goveđi serumski albumin (Sigma-Aldrich, ≥98%).

3.3.4.2.11. Određivanje koncentracije proteina u plazmi

Proteini u plazmi određeni su biuretskom metodom (Burtis i sar., 2012), koja se zasniva na reakciji proteina iz uzorka sa bakar (II) jonom u alkalnoj sredini pri čemu nastaje obojen kompleks sa apsorpcionim maksimumom na 545 nm. Metoda je izvedena pomoću komercijalno dostupnog reagensa Biuret (COD 11500, BioSystems S.A., Španija) prema uputstvu proizvođača. Kao standard korišćen je goveđi serumski albumin (Sigma-Aldrich, ≥98%).

3.3.4.2.12. Izračunavanje indeksa oksidativnog stresa

Indeks oksidativnog stresa (OSI) izračunavan je kao količnik biomarkera TOS i TAS, i predstavlja neimenovan broj (Aycicek i Erel, 2007).

3.3.5. Ispitivanje dozne zavisnosti antidotskih efekata oksima K203 i K027

Nakon inicijalnog ispitivanja reaktivatorskog i antioksidativnog potencijala oksima primenjenih u dozi 5% LD₅₀, u cilju ispitivanja dozne zavisnosti ovih efekata oksima K203 i K027, istim eksperimentalnim protokolima, određeni su intenziteti efekata još četiri doze K-oksima. Grupe eksperimentalnih životinja (5 pacova po grupi) tretirane su oksimom *i.m.* u dozama 1,25; 2,5; 5; 25 i 50% LD₅₀ (za oksim K203 9, 17, 35, 179 i 358 μmol/kg; za oksim K027 31, 63, 126, 632, 1264 μmol/kg) i/ili atropinom *i.m.* u dozi 10 mg/kg, neposredno nakon davanja DDVP-a *s.c.* u dozi 75% LD₅₀.

3.4. Statistička obrada podataka

Vrednosti srednjih letalnih doza (LD_{50}) oksima, dihlorvosa i dihlorvosa uz antidotski tretman, sa 95% granicama pouzdanosti, izračunate su prema metodi Litchfield i Wilcoxon (1949) korišćenjem softvera PHARM (Pharmacologic Calculation System, ver.4.0, 1986 Springer-Verlag, New York, SAD). Korišćenjem istog softvera i prema istoj metodi utvrđena je statistička značajnost razlika efikasnosti antidotskih tretmana na osnovu odnosa potentnosti izračunatih LD_{50} (engl. *potency ratio test*).

Za ispitivanje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti određivanih biomarkera između različitih tretmana u zavisnosti od distribucije podataka korišćeni su jednofaktorska analiza varijanse – ANOVA i post-hok LSD test ili *Kruskall–Wallise*-ov test praćen *Mann–Whitney U* testom. Veličina efekta za biomarkere oksidativnog stresa izražena u %, izračunavana je prema formuli $(Z/\sqrt{n}) \times 100$, gde je Z vrednost parametra *Mann–Whitney U* testa, a n ukupan broj uzoraka za dve poređene grupe. Podaci su analizirani softverom SPSS 18.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois), a za grafičko prikazivanje rezultata korišćen je softver GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA, USA).

U svim statističkim testovima značajnim je smatrana vrednost $p < 0,05$, dok trend označava p vrednost između 0,05 i 0,1 (može biti od biološkog značaja).

Za kvantitativnu statističku analizu odnosa doza-efekat metodologijom *Benchmark doze* (engl. *Benchmark dose, BMD*) (Slika 3), korišćen je softver PROAST verzija 65.5 (*Dutch National Institute for Public Health i the Environment (RIVM)*, Bilthoven, Holandija) (Crump, 1984; Slob, 2002a). Softver PROAST koristi *Akaike information criterion (AIC)* da odabere optimalan model unutar eksponencijalne i/ili *Hill*-ove familije modela na osnovu najmanje *AIC* vrednosti (EFSA, 2017, 2009). Ukratko, trend dozne zavisnosti je potvrđen ako je *AIC* vrednost modela manji od *AIC* vrednosti specifičnog *null* modela za više od dve jedinice ($AIC_{\min} < AIC_{\text{null}} - 2$). *Null* model opisuje situaciju kada ne postoji dozno zavistan trend, odnosno kriva doza-efekat predstavlja horizontalnu liniju ($y=a$) i pokazuje tendenciju najveće *AIC* vrednosti. Dalje, model sa najmanjom *AIC* vrednošću ne sme biti veći od *AIC* vrednost specifičnog *full* modela za više od dve jedinice ($AIC_{\min} < AIC_{\text{full}} + 2$). *Full*

model opisuje dozno zavisan trend izmerenog intenziteta efekta kao takvog, bez pretpostavke o bilo kakvom specifičnom odnosu doza-efekat i pokazuje tendenciju najmanje AIC vrednosti.

U matematičkim jednačinama modela, y predstavlja intenzitet efekta, x predstavlja dozu, dok su konstante var , a , b , c i d parametri krive koja je dobijena fitovanjem modela podacima doza-efekat (x - y). Parametar var predstavlja varijansu unutar grupe, parametar a predstavlja efekat pri nultoj dozi tzv. *background* efekat (parametar vertikalnog položaja krive), parametar b predstavlja potentnost hemikalije (parametar horizontalnog položaja krive), parametar c predstavlja maksimalni intenzitet efekta ($M=c$ za rastuće krive, $M=1/c$ za opadajuće krive) u odnosu na nivo *background* efekta (parametar oblika krive) i parametar d predstavlja strmost krive (parametar oblika krive).

U analizama je korišćen kombinovani BMD pristup sa kovarijansom, gde je tip oksima smatran kovarijansom, odnosno faktorom uticaja na krivu doza-efekat. Ovakva analiza identifikuje parametre modela koji su značajno različiti ili jednaki između dve krive doza-efekat (Slob, 2002).

Benchmark doza (BMD) je doza koja je izračunata iz modela doza-efekat za unapred definisanu veličinu promene efekta (porasta ili smanjenja), tzv. *Benchmark* odgovor (engl. *Benchmark response*, BMR).

U PROAST izveštaju za kontinuirane podatke, koriste se termini veličina kritičnog efekta (engl. *critical effect size*, CES) i doza kritičnog efekta (engl. *critical effect dose*, CED) umesto termina *Benchmark* odgovor (engl. *Benchmark response*, BMR) i *Benchmark* doza (engl. *Benchmark dose*, BMD), redom (Slob i Pieters, 1998), i stoga su korišćeni u ovoj disertaciji.

Interval pouzdanosti CED je ograničen donjom (engl. lower, CEDL) i gornjom (engl. upper, CEDU) granicom i iznosi 90% (standardna vrednost u PROAST softveru), a njihov odnos CEDU/CEDL predstavlja meru preciznosti izračunate CED (Slob, 2014a).

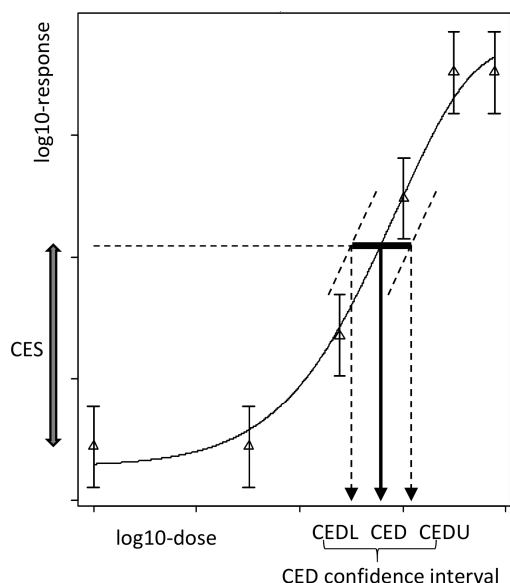
Grafici koji prikazuju intervale pouzdanosti parametara krivih, kao i izračunatih CED, su korišćeni za poređenje razlika sa ciljem uzimanja u obzir i preciznosti, tako da se dve krive doza-efekat smatraju statistički različitim u onom

parametru čiji se intervali pouzdanosti ne preklapaju (Bemis i sar., 2016; Wills i sar., 2017, 2016a, 2016b).

CES se definiše kao veličina promene u srednjoj vrednosti efekta, izražena u procentima, u odnosu na veličinu tzv. *background* efekta, tj. veličinu efekta pri nultoj dozi. Efekat-specifične vrednosti CES su izračunavane koristeći statistički metod uspostavljen od strane Wout Slob-a (2017) i zasnovan na opštoj teoriji o veličini efekta datoj u istom radu.

Model iz eksponencijalne familije koji izračunava faktor relativne potentnosti (engl. *relative potency factor*, RPF) je korišćen sa ciljem kvantifikovanja razlike u potentnosti CED jedne supstance u odnosu na drugu referentnu supstancu. U ovom modelu, CED jednog oksima se izražava kao RPF u odnosu na CED referentnog oksima ($RPF_{\text{oksima}} = \text{CED}_{\text{referentnog oksima}} / \text{CED}_{\text{oksima}}$, $RPF > 1$, veća potentnost, manja CED). Ovim modelom dobijen je i 90% interval pouzdanosti vrednosti RPF.

U cilju kvantifikovanja promene efekta u funkciji doze, izračunavan je CED odnos, kao količnik CED za efekat jakog i efekat umerenog intenziteta (Slob i Setzer, 2014).



Parametar	Značenje
var	Varijansa
a	Efekat pri nultoj dozi (engl. <i>background effect</i>)
b	Potentnost
c	Maksimalni efekat
d	Strmost krive
CES	Veličina kritičnog efekta (engl. <i>critical effect size</i>)
CED	Doza kritičnog efekta (engl. <i>critical effect dose</i>)
CEDL	Donja granica pouzdanosti doze (engl. <i>lower</i> , CEDL)
CEDU	Gornja granica pouzdanosti doze (engl. <i>upper</i> , CEDU)

Slika 3. Šematska ilustracija metodologije Benchmark doze na hipotetičkom setu kontinuiranih podataka i značenje termina u legendi sa desne strane PROAST grafika. Efekat i doza su prikazani na log10 skali. Trouglovi predstavljaju geometrijske sredine izmerenog efekta sa 90% intervalom pouzdanosti (vertikalne pune linije) pri rastućim ispitivanim dozama. Puna kriva linija predstavlja fitovan model zavisnosti doza-efekat. Isprekidane krive linije predstavljaju 90% donju i gornju granicu pouzdanosti fitovane krive doza-efekat, a njihovi preseki sa horizontalnom isprekidanom linijom predstavljaju 90% donju i gornju granicu pouzdanosti doze kritičnog efekta.

4. REZULTATI

4.1. Akutna toksičnost oksima

Akutna *i.m.* toksičnost oksima se smanjivala sledećim redosledom: obidoksim > trimedoksim > K203 > pralidoksim > azoksim > K027 (Tabela 2). Oba eksperimentalna oksima, K203 i K027, su pokazala manju toksičnost od obidoksima i trimedoksima. Najmanje toksičan oksim K027 pokazao je oko pet puta manju toksičnost od najtoksičnijeg obidoksima. Prvi simptomi trovanja pacova oksimima javljali su se ubrzo nakon davanja. Generalno, fascikulacija mišića i tremor javljali su se u roku 5-10 minuta od tretmana. Centralni simptomi, kao što su ataksija, dispneja i tremor, zatim nikotinski, fascikulacije, kao i muskarinski simptomi, salivacija, trajali su tokom 30-60 minuta od tretmana. Životinje su uginjavale u roku 30-50 minuta od tretmana oksimima, a stopa smrtnosti se nije menjala nadalje do 24 h. Sve životinje koje nisu uginule oporavile su se tokom 24-časovnog perioda posmatranja.

Tabela 2. Srednje letalne doze (LD_{50} , *i.m.*) oksima kod mužjaka *Wistar* pacova

Oksim	LD_{50} (mmol/kg)	95% granice pouzdanosti
K203	0,71	0,58-0,88
K027	2,53	2,00-3,19
obidoksim	0,49	0,36-0,65
trimedoksim	0,51	0,50-0,53
pralidoksim	1,24	1,10-1,39
azoksim	2,12	1,83-2,45

Kod mužjaka *Wistar* pacova, kojima je supkutano injiciran samo DDVP, javio se širok spektar dozno zavisnih kliničkih znakova toksičnosti. Generalno, mišićne fascikulacije i tremor javljali su se 1-2 minuta po injiciranju DDVP-a, dok su se konvulzije javljale 3-4 minuta kasnije. Tokom akutne faze intoksikacije kod svih životinja uočavana je lakrimacija, salivacija, nakostrešenost dlake, dispneja i pojava tzv. Straubovog repa. Letalni efekat se javljao u roku 20-30 minuta od tretmana, a stopa smrtnosti se nije menjala nadalje do 24 h. Životinje koje nisu uginule oporavile su se tokom 24-časovnog perioda posmatranja, ali je tremor bio prisutan približno

četiri sata. Vrednost srednje supkutane letalne doze DDVP-a sa 95% granicama pouzdanosti iznosila je 8,9 (8,2-9,8) mg/kg, odnosno 40 (37-44) μ mol/kg.

4.2. Terapijski potencijal oksima kod pacova trovanih dihlorvosom

Oksim K027 je bio najefikasniji u smanjivanju akutne toksičnosti DDVP-a, obezbeđujući stopu preživljavanja životinja 50% pri dozi koja odgovara čak 21xLD₅₀ DDVP-a (Tabela 3). Terapijska efikasnost oksima K203 (TI=7,1) bila je 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, sa vrednošću terapijskog indeksa 11,6, dok je sa druge strane, azoksim pokazao najmanju sposobnost da antagonizuje akutnu toksičnost DDVP-a kod pacova sa vrednošću terapijskog indeksa 2,8.

Tabela 3. Terapijski efekat oksima (5% LD₅₀, *i.m.*) kod mužjaka *Wistar* pacova trovanih dihlorvosom (DDVP, *s.c.*)

Tretman	LD ₅₀ (mmol/kg)	95% granice pouzdanosti	TI
DDVP	0,04	0,04-0,04	—
DDVP + K203	0,29 ^{ad}	0,18-0,47	7,1
DDVP + K027	0,84 ^{ab}	0,48-1,47	20,9
DDVP + obidoksim	0,47 ^{ac}	0,40-0,54	11,6
DDVP + trimedoksim	0,18 ^{ad}	0,16-0,20	4,4
DDVP + pralidoksim	0,14 ^a	0,08-0,25	3,5
DDVP + azoksim	0,11 ^a	0,09-0,15	2,8

TI, terapijski indeks antidota = LD₅₀ (DDVP+antidot) / LD₅₀ (DDVP), neimenovan broj;

^a značajan odnos potentnosti vs. grupa DDVP;

^b značajan odnos potentnosti vs. grupa obidoksim, trimedoksim, pralidoksim ili azoksim;

^c značajan odnos potentnosti vs. grupa trimedoksim, pralidoksim ili azoksim;

^d značajan odnos potentnosti vs. grupa azoksim.

Uključivanje antiholinergičkog leka, atropina u dozi 10 mg/kg *i.m.*, uz oksim jasno je poboljšalo terapijski efekat antidotskog tretmana protiv akutne toksičnosti DDVP-a (Tabela 4). Sam atropin smanjio je akutnu toksičnost DDVP-a oko 10 puta. Dodavanje oksima K203, trimedoksima, pralidoksima ili azoksima, dovelo je do

povećanja terapijskog indeksa oko 3 puta u odnosu na sam atropin. Najveća stopa preživljavanja životinja akutno trovanih DDVP-om dobijena je kada su oksim K027 ili obidoksim primenjeni u kombinaciji sa atropinom, pri čemu su terapijski indeksi ova dva oksima bili približno izjednačeni ($TI_{K027}=37,4$ vs. $TI_{obidoksim}=39,6$).

Tabela 4. Terapijski efekat oksima (5% LD₅₀, *i.m.*) i atropina (10 mg/kg, *i.m.*) kod mužjaka *Wistar* pacova trovanih dihlorvosom (DDVP, *s.c.*)

Tretman	LD ₅₀ (mmol/kg)	95% granice pouzdanosti	TI
DDVP	0,04	0,04-0,04	—
DDVP + atropin	0,41	0,26-0,66	10,2
DDVP + atropin + K203	1,22 ^a	1,05-1,41	30,3
DDVP + atropin + K027	1,51 ^{ab}	1,25-1,82	37,4
DDVP + atropin + obidoksim	1,59 ^{ab}	1,36-1,86	39,6
DDVP + atropin + trimedoksim	1,30 ^a	0,95-1,78	32,3
DDVP + atropin + pralidoksim	1,18 ^a	0,92-1,52	29,4
DDVP + atropin + azoksim	1,18 ^a	0,90-1,55	29,3

TI, terapijski indeks antidota = LD₅₀ (DDVP+antidot) / LD₅₀ (DDVP), neimenovan broj;

^a značajan odnos potentnosti vs. grupa atropin;

^b značajan odnos potentnosti vs. grupa atropin+K203, pralidoksim ili azoksim.

Uporedni prikaz terapijskih indeksa oksima primenjenih samostalno ili uz atropin, kao i njihov odnos, dat je u Tabeli 5. Oksimi su u Tabeli 5 navedeni redosledom koji odgovara povećanju vrednosti odnosa njihovih terapijskih indeksa kada su primenjeni u kombinaciji sa atropinom i samostalno. Uključivanje atropina u antidotski tretman dovelo je do najvećeg uticaja na terapijsku efikasnost azoksima, dok je najmanji uticaj imalo na terapijsku efikasnost oksima K027. U odnosu na oksim K027, uključivanje atropina je imao približno dvostruko veći uticaj na povećanje terapijske efikasnosti oksima K203, kao i obidoksima.

Tabela 5. Odnosi terapijskih indeksa oksima i kombinacija oksima sa atropinom

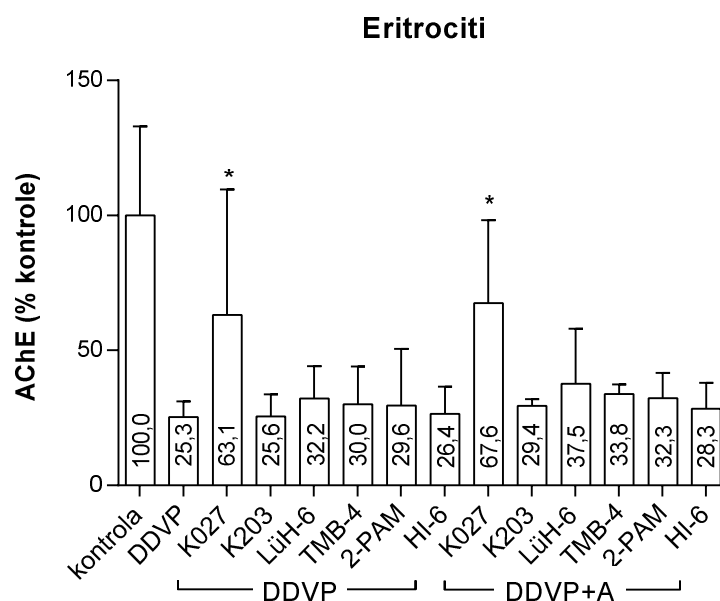
Oksim	TI _{oksim}	TI _{oksim+atropin}	Odnos TI _{oksim+atropin} / TI _{oksim}
K027	20,9	37,4	1,8
obidoksim	11,6	39,6	3,4
K203	7,1	30,3	4,2
trimedoksim	4,4	32,3	7,3
pralidoksim	3,5	29,4	8,4
azoksim	2,8	29,3	10,4

TI, terapijski indeks antidota = LD₅₀ (DDVP+antidot) / LD₅₀ (DDVP), neimenovan broj.

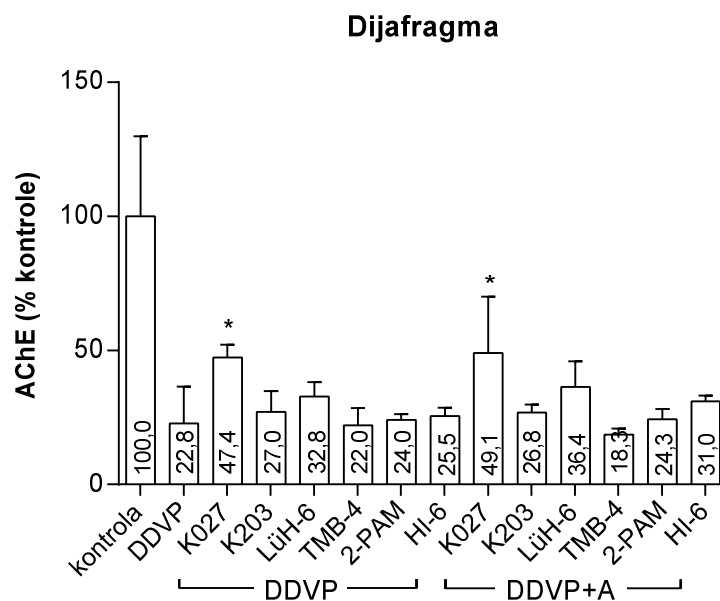
4.3. Reaktivatorski potencijal oksima kod pacova trovanih dihlorvosom

Nakon supkutanog davanja doze od 75% LD₅₀ DDVP-a, (6,7 mg/kg; 30 μmol/kg), u odnosu na aktivnost AChE kod zdravih netretiranih mužjaka *Wistar* pacova preostalo je u eritrocitima 25%, u dijafragmi 23% i u mozgu 28% aktivnosti enzima (Slika 4-Slika 6). Značajna reaktivacija enzima postignuta je samo oksimom K027 ili njegovom kombinacijom sa atropinom u eritrocitima i dijafragmi (Slika 4 i Slika 5). U dijafragmi pacova kombinacija oksima K027 i atropina povećala je aktivnost enzima na 49% (p=0,006), dok je aktivnost enzima u eritrocitima dostigla 67% (p=0,000) od vrednosti u netretiranoj kontrolnoj grupi. Nivo reaktivacije AChE u mozgu pacova postignut oksimom K027, samostalno ili u kombinaciji sa atropinom, bio je niži od 10%, a aktivnost enzima se nije značajno razlikovala ni od nivoa u grupi tretiranoj samo DDVP-om, niti u grupama tretiranim oksimom K203, obidoksimom, trimedoksimom, pralidoksimom ili azoksimom (Slika 6). Oksim K203 nije doveo do značajne reaktivacije AChE ni u jednom od tri ispitivana tkiva. Među standardno korišćenim oksimima jedino je obidoksim doveo do porasta aktivnosti DDVP-om inhibirane AChE u eritrocitima i dijafragmi, ali ovaj porast, kao ni kod ostalih standardnih oksima, nije bio statistički značajan.

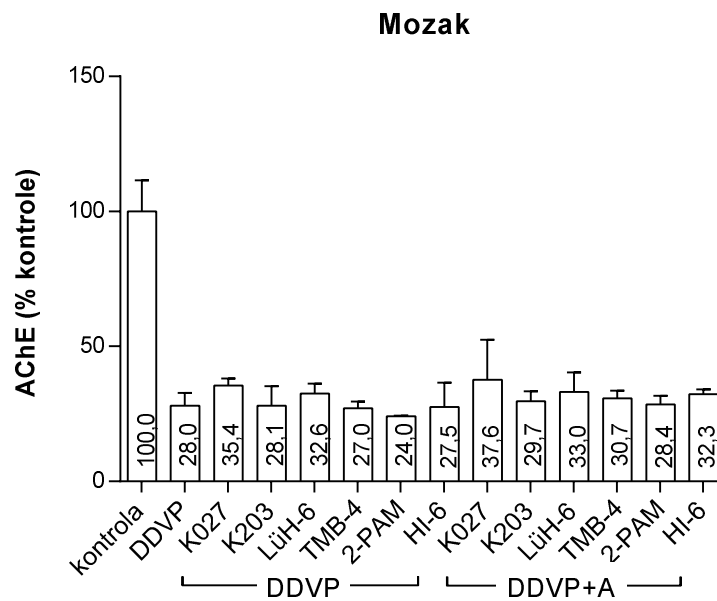
U plazmi je nakon supkutanog davanja doze od 75% LD₅₀ DDVP-a preostalo 63% aktivnosti BuChE u odnosu na aktivnost enzima kod zdravih netretiranih mužjaka *Wistar* pacova (Slika 7). Značajan porast aktivnosti BuChE inhibirane DDVP-om dobijen je nakon tretmana oksimom K027, K203 ili obidoksimom (75%, 73%, 82% aktivnosti kontrole; p=0,007; 0,038; 0,000, redom), kao i njihovim kombinacijama sa atropinom (79%, 74%, 78% aktivnosti kontrole; p=0,001; 0,016; 0,002, redom). Međutim, iako je DDVP izazvao inhibiciju od "samo" 37% aktivnosti BuChE, nijedan od primenjenih oksima nije uspeo da reaktivira enzim tako da se dostigne nivo aktivnosti u kontrolnoj grupi.



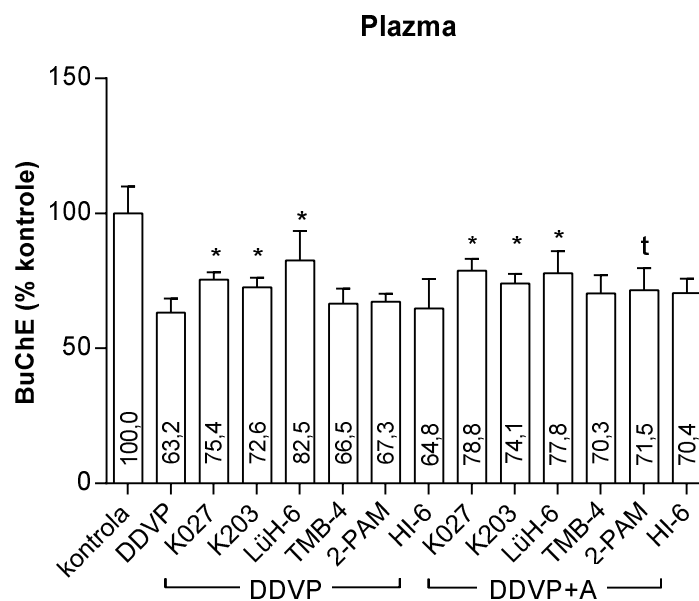
Slika 4. Aktivnost AChE u eritrocitima mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c.*), oksima (5% LD₅₀, *i.m.*) i/ili atropina (A, 10 mg/kg, *i.m.*). Aktivnost AChE ($\bar{x}_{sr} \pm SD$, n=5) je izražena kao % aktivnosti AChE netretirane kontrolne grupe ($3,25 \pm 1,06 \mu\text{mol/min po mL}$ eritrocita). * $p < 0,05$ vs. DDVP (ANOVA, *post hoc* LSD).



Slika 5. Aktivnost AChE u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c.*), oksima (5% LD₅₀, *i.m.*) i/ili atropina (A, 10 mg/kg, *i.m.*). Aktivnost AChE ($\bar{x}_{sr} \pm SD$, n=5) je izražena kao % aktivnosti AChE netretirane kontrolne grupe ($0,82 \pm 0,24 \mu\text{mol/min po g}$ tkiva). * $p < 0,05$ vs. DDVP (ANOVA, *post hoc* LSD).



Slika 6. Aktivnost AChE u mozgu mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c*), oksima (5% LD₅₀, *i.m*) i/ili atropina (A, 10 mg/kg, *i.m*). Aktivnost AChE ($\bar{x}_{sr} \pm SD$, n=5) je izražena kao % aktivnosti AChE netretirane kontrolne grupe (7,52±0,18 μmol/min po g tkiva). *p<0,05 vs. DDVP (ANOVA, *post hoc* LSD).



Slika 7. Aktivnost BuChE u plazmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c*), oksima (5% LD₅₀, *i.m*) i/ili atropina (A, 10 mg/kg, *i.m*). Aktivnost BuChE ($\bar{x}_{sr} \pm SD$, n=5) je izražena kao % aktivnosti enzima netretirane kontrolne grupe (652±64 U/L plazme). #p<0,05 vs. svi ostali tretmani, *p<0,05 vs. DDVP, [†](0,05<p<0,1) vs. DDVP (ANOVA, *post hoc* LSD).

4.4. Reaktivatorska efikasnost oksima K203 i K027 kod pacova trovanih dihlorvosom

4.4.1. Model dozne zavisnosti efekta reaktivacije acetilholinesteraze eritrocita

Model 5 iz eksponencijalne i *Hill*-ove familije modela bio je najbolja procena odnosa nivoa aktivnosti eritrocitne AChE i šest doznih nivoa (uključujući nultu dozu) oksima K203 i K027 (Slika 8A). Međutim, dobijene vrednosti AIC parametra modela 5 ($AIC_{exp} = -62,44$, $AIC_{Hill} = -61,7$) bile su za više od dve jedinice veće nego AIC vrednost tzv. *full* modela ($AIC_{full} = -69,84$) (Slika 8A3), pokazujući da nije zadovoljen kriterijum za postojanje dozno-zavisnog trenda. Uzrok ovome bilo je to što je nivo efekta dobijen pri najvišoj dozi oksima K027 bitno odstupao od modela (kriva ne prolazi kroz interval pouzdanosti geometrijske sredine izmerenog efekta) (Slika 8A). Stoga su podaci bili ponovo analizirani izostavljajući najvišu testiranu dozu oksima K027. Ovim je dobijen značajno bolji model 5 koji ispunjava kriterijum za dozno-zavisni trend sa AIC vrednostima ($AIC_{exp} = -64,64$, $AIC_{Hill} = -65,14$) nižim od vrednosti tzv. *full* modela ($AIC_{full} = -61,04$). Ovaj model, prikazan na slici 32B, pokazuje da se dve krive doza-efekat koje odgovaraju oksimima K203 i K027, značajno razlikuju u parametru b (eksponencijalni model: $b\text{-K203} = 0,001613$ i $b\text{-K027} = 0,003566$) ukazujući da se oksimi razlikuju u potentnosti da reaktiviraju DDVP-inhibiranu AChE eritrocita.

Iz praktičnog razloga lakšeg praćenja dobijenih rezultata analize, kao i nepostojanja značajne razlike u rezultatima analize eksponencijalnim i *Hill*-ovim modelom, u daljem tekstu su navedeni rezultati analize eksponencijalnim modelom, dok su na slikama prikazani rezultati analiza obe familije modela.

Maksimalna reaktivacija eritrocitne AChE procenjena je na 2,7-puta, odnosno izraženo u % iznosi $(2,7-1) \times 100 = 170\%$, dok je vrednost standardne devijacije unutar grupe procenjena na $\sqrt{0,014} = 0,12$ (Slika 8B1). Uzimajući u obzir intervale pouzdanosti za M (2,4-3) i s (0,10-0,14), dobijena kombinacija vrednosti M i s najbliže odgovara kombinaciji $M = 2,5$ i $s = 0,131$, utvrđenoj od strane Wout Slob-a (2017) kao kvantitativan odnos između M i s . Stoga je vrednost $M = 2,5$ odabrana kao reprezentativna maksimalna veličina efekta reaktivacije AChE eritrocita oksimima

K203 i K027 za dobijeni set podataka u ovom eksperimentu i izračunata su tri intenziteta efekta na sledeći način:

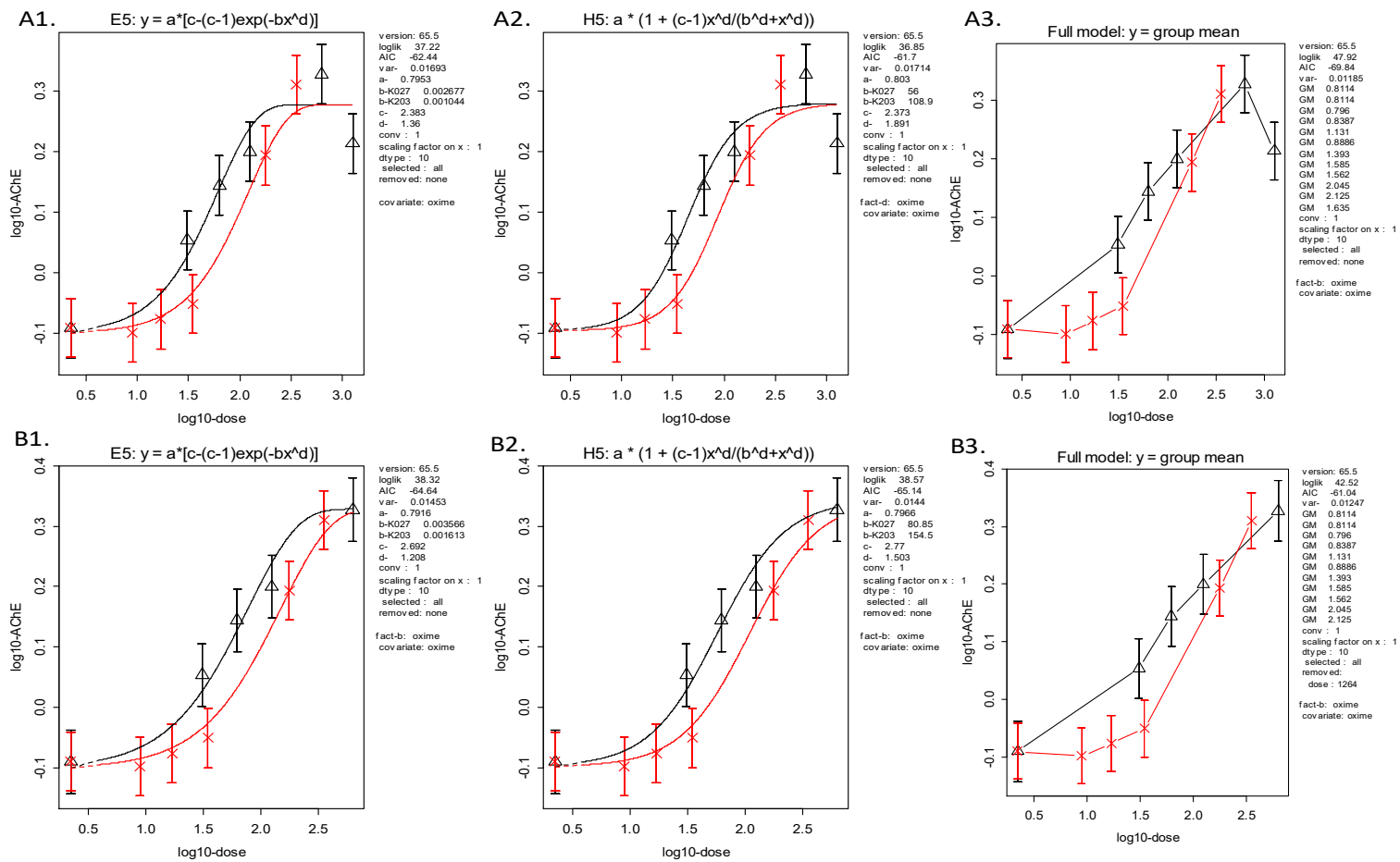
Jak efekat = $M^{1/2} = 2,5^{1/2} = 1,581$ puta povećanje efekta ili 58%,

Umeren efekat = $M^{1/4} = 2,5^{1/4} = 1,257$ puta povećanje efekta ili 26%,

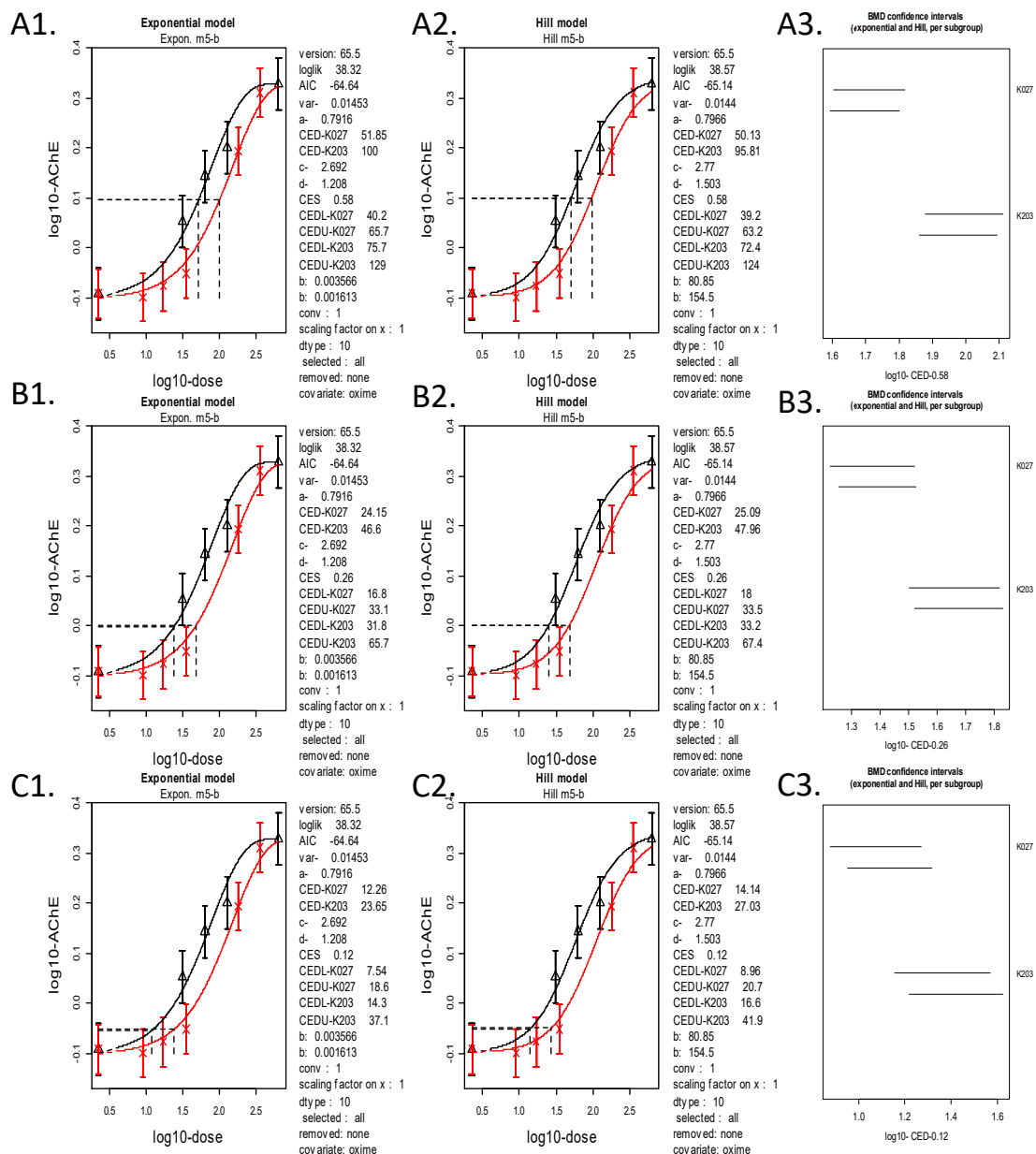
Slab efekat = $M^{1/8} = 2,5^{1/8} = 1,121$ puta povećanje efekta ili 12%.

Doze pri kojima oksimi K027 i K203 ostvaruju prethodno definisane intenzitete efekta reaktivacije eritrocitne AChE 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 $CED_{12}=24$ $\mu\text{mol/kg}$ (Slika 9). Dodatno, na Slici 9 (A3, B3, C3) prikazani su 90% intervali pouzdanosti procenjenih doza za oba oksima i sva tri intenziteta efekta. Isti intenzitet efekta (bilo da se posmatra jak, umeren ili slab) postiže se nižom dozom oksima K027, pokazujući veću reaktivatorsku potentnost oksima K027 u eritrocitima. Oksim K027 pokazuje 1,929 (interval pouzdanosti 1,51-2,45) puta veću potentnost (odnosno nižu dozu) u odnosu na oksim K203 ($CED_{K203}=RPF \times CED_{K027}$) za reaktivaciju AChE inhibirane DDVP-om u eritrocitima (Slika 10). Pokazano je takođe da je vrednost RPF nezavisna od intenziteta efekta (ista vrednost RPF je dobijena pri sva tri intenziteta efekta CES=12%, 26% ili 58%), predstavljajući tako meru poređenja kompletnih krivih doza-efekat oksima K027 i K203. Ipak, skaliranje intervala pouzdanosti izračunatih CED se menja sa promenom veličine efekta (Slika 9A3-C3). Pri slabom intenzitetu efekta CED-intervali pouzdanosti, koji pripadaju oksimima K027 i K203 se znatno preklapaju, ukazujući da potentnost ne može biti statistički pouzdano razlikovana (Slika 9C3). Pri umerenom intenzitetu efekta gornja granica pouzdanosti CED oksima K027 se preklapa sa donjom granicom pouzdanosti CED oksima K203, ukazujući da razlika u potentnosti može biti veoma mala (Slika 9C3). Konačno, pri jakom intenzitetu efekta CED-intervali pouzdanosti se ne preklapaju dozvoljavajući statistički podržan rang veće potentnosti oksima K027 u poređenju sa oksimom K203 (Slika 9A3).

Preciznost u proceni CED, izražena kao odnos $CEDU/CEDL$, se povećava sa porastom intenziteta efekta (Tabela 6) rezultirajući faktorima 1,6 i 1,7 za oksim K027 i K203, redom, pokazujući da je informativnost doza-efekat podataka prilično dobra.

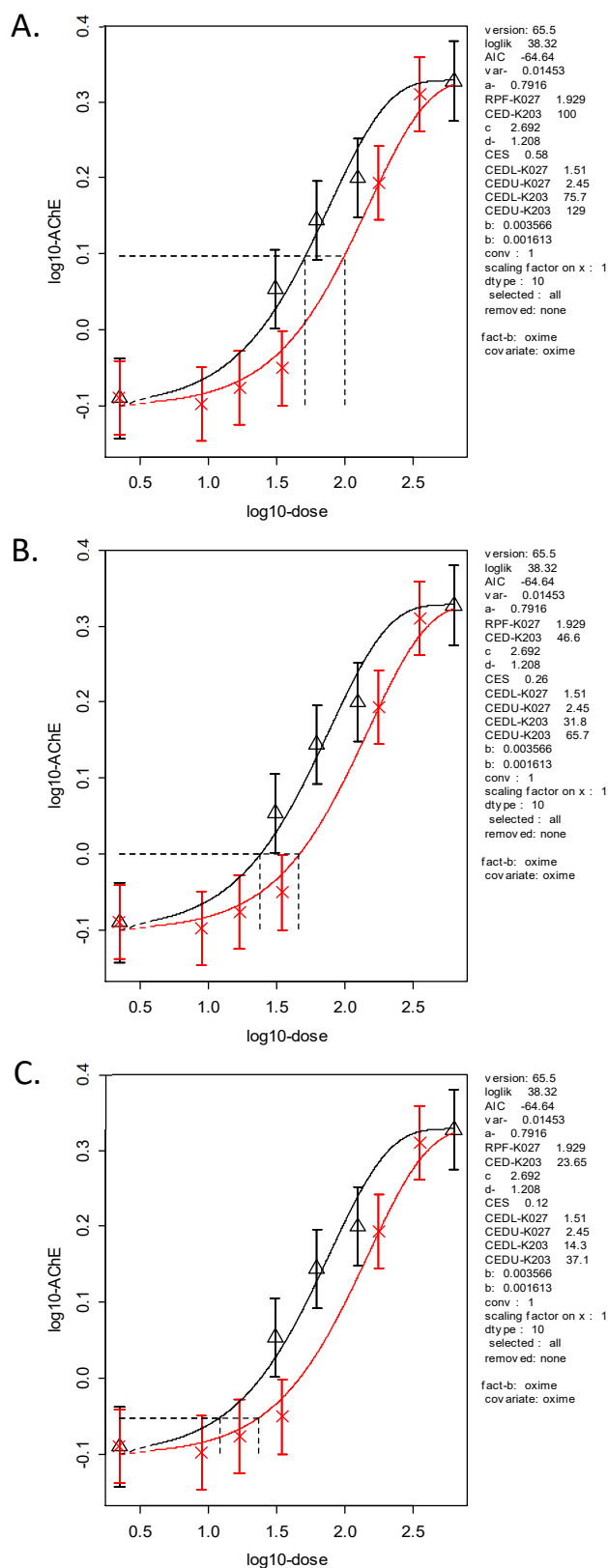


Slika 8. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) i aktivnosti AChE u eritrocitima mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni model 5 (1), Hill-ov model 5 (2) i full model (3) sa (A) i bez (B) najviše dozne grupe oksima K027.



Slika 9. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) i aktivnosti AChE u eritrocitima mužjaka Wistar pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni (A1, B1, C1) i Hill-ov (A2, B2, C2) model 5. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju doze kritičnog efekta oksima (engl. critical effect dose, CED, $\mu\text{mol/kg}$) za tri intenziteta efekta (engl. critical effect size, CES) 58% (A), 26% (B) i 12% (C). Na graficima označenim brojem 3 prikazani su 90% intervali pouzdanosti doze kritičnog efekta oksima K027 i K203 (za eksponencijalni i Hill-ov model) za tri intenziteta efekta (A3, B3 i C3).

E15 in terms of RPFs



Slika 10. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) i aktivnosti AChE u eritrocitima mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju fitovan eksponencijalni model, koji uključuje izračunavanje relativnog faktora potentnosti (engl. *relative potency factor*, RPF) kao parametra modela. RPF izražava dozu kritičnog efekta (engl. *critical effect dose*, CED) oksima K027 u odnosu na CED oksima K203 (RPF>1, veća potentnost, manja CED). Vrednosti RPF-K027 (neimenovan broj), CED-K203 ($\mu\text{mol/kg}$) zajedno sa 90% intervalima pouzdanosti su prikazani u legendi sa desne strane svakog grafika. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju RPF-K027 i CED-K203 za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 58% (A), 26% (B) i 12% (C).

Tabela 6. Doze kritičnog efekta ($\mu\text{mol/kg}$) oksima K027 i K203 sa 90% granicama pouzdanosti i mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) za tri intenziteta efekta reaktivacije AChE eritrocita

		Eksponecijalni model m5-b		Hill-ov model m5-b	
		K027	K203	K027	K203
CES=58%	CED	52	100	50	96
	CEDL	40	76	39	72
	CEDU	66	129	63	124
	CEDU/CEDL	1,6	1,7	1,6	1,7
CES=26%	CED	24	47	25	48
	CEDL	17	32	18	33
	CEDU	33	66	34	67
	CEDU/CEDL	2,0	2,1	1,9	2,0
CES=12%	CED	12	24	14	27
	CEDL	8	14	9	17
	CEDU	19	37	21	42
	CEDU/CEDL	2,5	2,6	2,3	2,5

CED - engl. *critical effect dose*; CEDL - engl. *lower, donja* i CEDU - engl. *upper, gornja* granica pouzdanosti CED; CES - engl. *critical effect size*.

Kada su rastuće doze oksima K203 i K027 primenjene uz 10 mg/kg atropina dobijen je model 5 iz ekspancijalne i *Hill*-ove familije modela, kao najbolja procena odnosa doza i nivoa aktivnosti eritrocitne AChE (Slika 11A). Dobijene vrednosti AIC parametra modela 5 ($AIC_{\text{exp}} = -36,7$, $AIC_{\text{Hill}} = -36,2$) bile su za više od dve jedinice veće nego AIC vrednost tzv. *full* modela ($AIC_{\text{full}} = -45,54$) (Slika 11A), pokazujući da nije zadovoljen kriterijum za postojanje dozno-zavisnog trenda. Uzrok ovome bilo je to što je nivo efekta dobijen pri najvišoj dozi oksima K027 bitno odstupao od modela (kriva ne prolazi kroz interval pouzdanosti geometrijske sredine izmerenog efekta) (Slika 11A). Stoga su podaci bili ponovo analizirani izostavljajući najvišu testiranu dozu oksima K027. Ovim je dobijen značajno bolji model 5 koji ispunjava kriterijum za dozno-zavisni trend sa AIC vrednostima ($AIC_{\text{exp}} = -50,32$, $AIC_{\text{Hill}} = -50,48$) nižim od vrednosti tzv. *full* modela ($AIC_{\text{full}} = -44,28$). Ovaj model (Slika 11B) pokazuje da se dve krive doza-efekat koje odgovaraju oksimima K203 i K027, značajno razlikuju u parametru b (ekspancijalni model: $b\text{-K203}+A=0,0004744$ i $b\text{-K027}+A=0,0011$) ukazujući da se oksimi dati u kombinaciji sa atropinom razlikuju u potentnosti da reaktiviraju AChE eritrocita inhibiranu DDVP-om.

Iz praktičnog razloga lakšeg praćenja dobijenih rezultata analize, kao i nepostojanja značajne razlike u rezultatima analize eksponencijalnim i *Hill*-ovim modelom, u daljem tekstu su navedeni rezultati analize eksponencijalnim modelom, dok su na slikama prikazani rezultati analiza obe familije modela.

Maksimalna reaktivacija eritrocitne AChE oksimima K203 i K027 primenjenih sa 10 mg/kg atropina (*i.m.*), procenjena je na 2,7-puta, odnosno izraženo u % iznosi $(2,7-1) \times 100 = 170\%$, dok je vrednost standardne devijacije unutar grupe procenjena na $\sqrt{0,01885} = 0,137$ (Slika 11B1). Uzimajući u obzir intervale pouzdanosti dobijena kombinacija vrednosti M (2,47-3,03) i s (0,118-0,162) najbliže odgovara kombinaciji $M=2,5$ i $s=0,131$, utvrđenoj od strane Wout Slob-a (2017) kao kvantitativan odnos između M i s . Stoga je vrednost $M=2,5$ odabrana kao reprezentativna maksimalna veličina efekta reaktivacije AChE eritrocita oksimima K203 i K027 primenjenih sa atropinom i izračunata su tri intenziteta efekta na sledeći način:

Jak efekat = $M^{1/2} = 2,5^{1/2} = 1,581$ puta povećanje efekta ili 58%,

Umeren efekat = $M^{1/4} = 2,5^{1/4} = 1,257$ puta povećanje efekta ili 26%,

Slab efekat = $M^{1/8} = 2,5^{1/8} = 1,121$ puta povećanje efekta ili 12%.

Doze pri kojima oksimi K027 i K203 ostvaruju prethodno definisane intenzitete efekta reaktivacije eritrocitne AChE su: za oksim K027 $CED_{58}=47$ $\mu\text{mol/kg}$, $CED_{26}=26$ $\mu\text{mol/kg}$ i $CED_{12}=15$ $\mu\text{mol/kg}$, a za oksim K203 $CED_{58}=82$ $\mu\text{mol/kg}$, $CED_{26}=45$ $\mu\text{mol/kg}$ i $CED_{12}=26$ $\mu\text{mol/kg}$ (Slika 12). Isti intenzitet efekta (bilo da se posmatra jak, umeren ili slab) postiže se nižom dozom oksima K027, pokazujući veću reaktivatorsku potentnost oksima K027 u eritrocitima i pri primeni atropina. Dat uz atropin, oksim K027 pokazuje 1,729 (interval pouzdanosti 1,33-2,24) puta veću potentnost (odnosno nižu dozu) u odnosu na oksim K203 ($CED_{K203} = RPF \times CED_{K027}$) za reaktivaciju AChE inhibirane DDVP-om u eritrocitima (Slika 13). Pokazano je takođe da je vrednost RPF nezavisna od veličine efekta (ista vrednost RPF je dobijena pri sva tri intenziteta efekta CES=12%, 26% ili 58%). Ipak, skaliranje intervala pouzdanosti izračunatih CED se menja sa promenom intenziteta efekta (Slika 12A3-C3). Pri slabom i umerenom efektu CED-intervali pouzdanosti, koji pripadaju oksimima K027 i K203 se preklapaju, ukazujući da potentnost ne može biti statistički pouzdano razlikovana (Slika 12C3). Konačno, pri jakom efektu

CED-intervali pouzdanosti se ne preklapaju dozvoljavajući statistički podržan rang veće potentnosti oksima K027 u poređenju sa oksimom K203 (Slika 12A3).

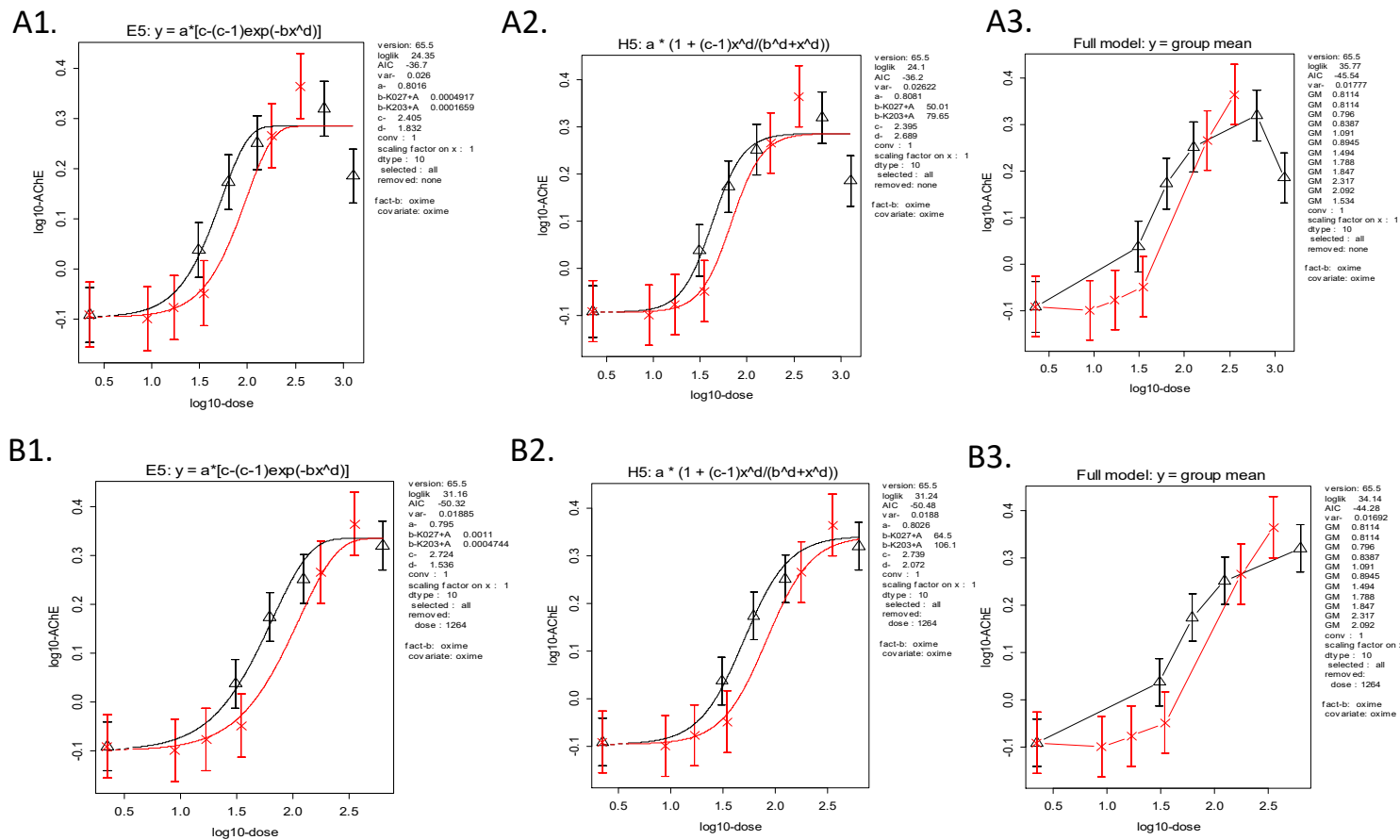
Preciznost u proceni CED, izražena kao odnos CEDU/CEDL, se povećavala sa porastom intenziteta efekta (Tabela 7) rezultirajući faktorima 1,6 i 1,7 za oksim K027 i K203 primenjenih sa atropinom, redom, pokazujući da je informativnost doza-efekat podataka prilično dobra, kao i u slučaju kada su oksimi primenjeni samostalno.

Tabela 7. Doze kritičnog efekta ($\mu\text{mol/kg}$) oksima K027 i K203 primenjenih sa atropinom (A) sa 90% granicama pouzdanosti i mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) reaktivacije AChE eritrocita

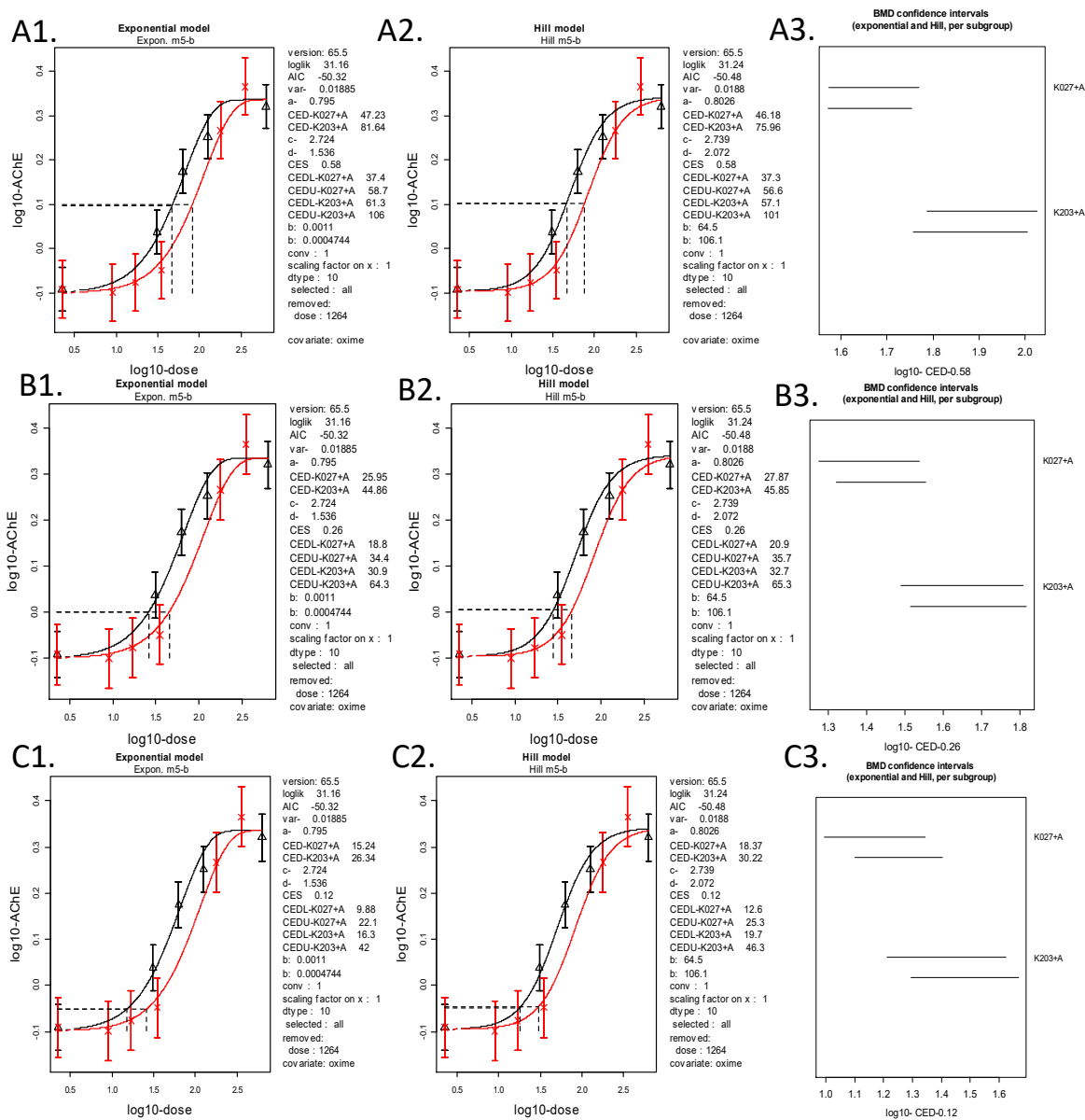
		Eksponecijalni model m5-b		Hill-ov model m5-b	
		K027+A	K203+A	K027+A	K203+A
CES=58%	CED	47	82	46	76
	CEDL	37	61	37	57
	CEDU	59	106	57	101
	CEDU/CEDL	1,6	1,7	1,5	1,8
CES=26%	CED	26	45	29	46
	CEDL	19	31	21	33
	CEDU	34	64	36	65
	CEDU/CEDL	1,8	2,1	1,7	2,0
CES=12%	CED	15	26	18	30
	CEDL	10	16	13	20
	CEDU	22	42	25	46
	CEDU/CEDL	2,2	2,6	2,0	2,4

CED - engl. *critical effect dose*; CEDL - engl. *lower*, donja i CEDU - engl. *upper*, gornja granica pouzdanosti CED; CES - engl. *critical effect size*.

Promena reaktivacije AChE eritrocita u funkciji doze K-oksima, izražena kroz odnos $\text{CED}_{\text{jak}}/\text{CED}_{\text{umeren}}$, bila je jednaka faktoru 2,2 (90% granice pouzdanosti 2,0-2,4), odnosno faktoru 1,8 (90% granice pouzdanosti 1,6-2,0) kada su K-oksimi primenjeni sa atropinom.

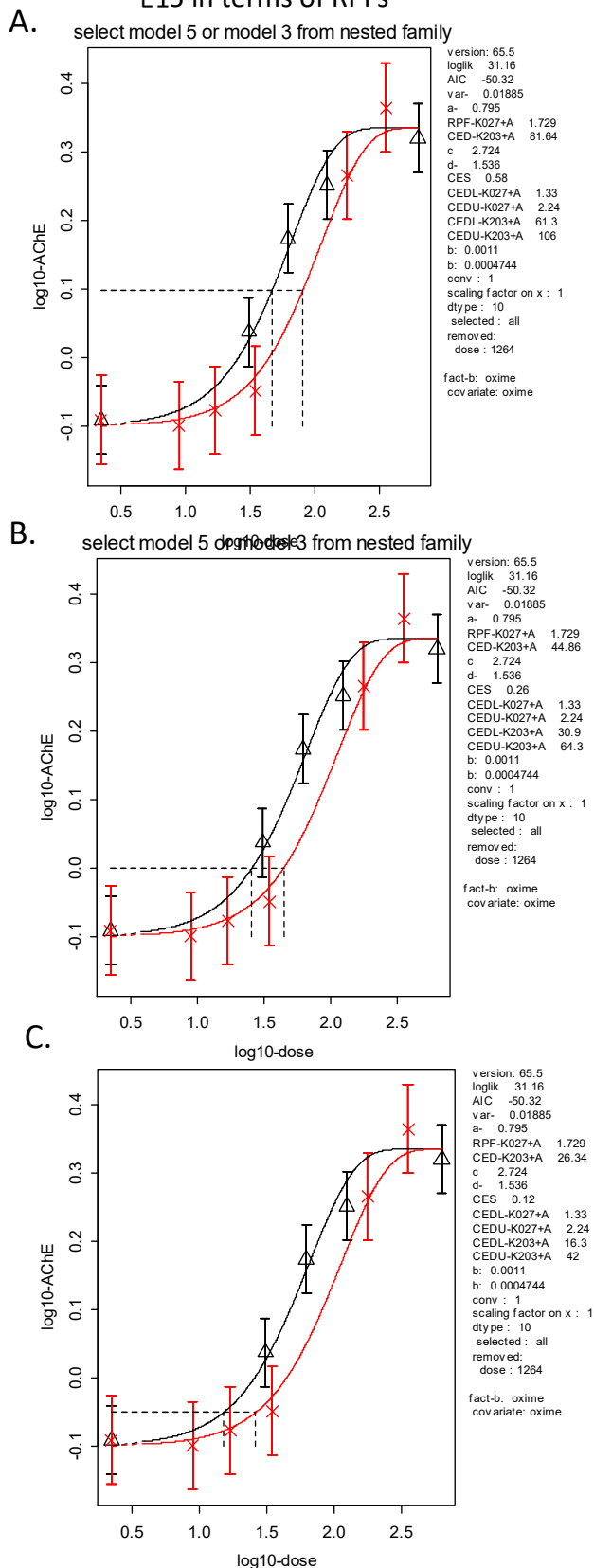


Slika 11. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) primenjenih sa atropinom (A) i aktivnosti AChE u eritrocitima mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni model 5 (1), *Hill*-ov model 5 (2) i *full* model (3) sa (A) i bez (B) najviše dozne grupe oksima K027.



Slika 12. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) primenjenih sa atropinom (A) i aktivnosti AChE u eritrocitima mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni (A1, B1, C1) i *Hill*-ov (A2, B2, C2) model 5. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju doze kritičnog efekta oksima (engl. *critical effect dose*, CED, $\mu\text{mol/kg}$) za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 58% (A), 26% (B) i 12% (C). Na graficima označenim brojem 3 prikazani su 90% intervali pouzdanosti doze kritičnog efekta oksima K027 i K203 (za eksponencijalni i *Hill*-ov model) za tri intenziteta efekta (A3, B3 i C3).

E15 in terms of RPFs



Slika 13. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) pri primenjenih sa atropinom (A) i aktivnosti AChE u eritrocitima mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju fitovan eksponencijalni model, koji uključuje izračunavanje relativnog faktora potentnosti (engl. *relative potency factor*, RPF) kao parametra modela. RPF izražava dozu kritičnog efekta (engl. *critical effect dose*, CED) oksima K027 u odnosu na CED oksima K203 (RPF>1, veća potentnost, manja CED). Vrednosti RPF-K027 (neimenovan broj), CED-K203 ($\mu\text{mol}/\text{kg}$) zajedno sa 90% intervalima pouzdanosti. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju RPF-K027 i CED-K203 za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 58% (A), 26% (B) i 12% (C).

4.4.2. Model dozne zavisnosti efekta reaktivacije acetilholinesteraze dijafragme

Model 5 iz eksponencijalne i *Hill*-ove familije modela bio je najbolja procena odnosa nivoa aktivnosti AChE dijafragme i šest doznih nivoa (uključujući nultu dozu) oksima K203 i K027 (Slika 14A). Međutim, slično nalazima u eritrocitima, nivo efekta dobijen pri najvišoj dozi oksima K027 je bitno odstupao od modela (kriva ne prolazi kroz interval pouzdanosti geometrijske sredine izmerenog efekta) (Slika 14A1-2). Posledično su dobijene vrednosti AIC parametra modela 5 ($AIC_{exp} = -46,02$, $AIC_{Hill} = -43,6$) bile za više od dve jedinice veće od AIC vrednosti tzv. *full* modela ($AIC_{full} = -56,04$) (Slika 14A3), pokazujući da nije zadovoljen kriterijum za postojanje dozno-zavisnog trenda. Stoga su podaci bili ponovo analizirani izostavljajući najvišu testiranu dozu oksima K027. Ovim je dobijen značajno bolji model 5 koji ispunjava kriterijum za dozno-zavisni trend sa AIC vrednostima ($AIC_{exp} = -53,92$, $AIC_{Hill} = -52,34$) nižim od vrednosti tzv. *full* modela ($AIC_{full} = -50,64$) (Slika 14B3). Ovaj model (Slika 14B) pokazuje značajnu razliku u parametru *b* dve krive doza-efekat koje odgovaraju oksimima K203 i K027 (eksponencijalni model: $b\text{-K203} = 0,008472$ i $b\text{-K027} = 0,03941$), ukazujući da se oksimi razlikuju u potentnosti da reaktiviraju DDVP-inhibiranu AChE dijafragme.

Iz praktičnog razloga lakšeg praćenja dobijenih rezultata analize, kao i nepostojanja značajne razlike u rezultatima analize eksponencijalnim i *Hill*-ovim modelom, u daljem tekstu su navedeni rezultati analize eksponencijalnim modelom, dok su na slikama prikazani rezultati analiza obe familije modela.

Maksimalna reaktivacija AChE dijafragme oksimima K203 i K027 procenjena je na 2,1-puta, odnosno izraženo u % iznosi $(2,1-1) \times 100 = 110\%$, sa intervalom pouzdanosti 1,88-2,35, dok je vrednost standardne devijacije unutar grupe procenjena na $\sqrt{0,017} = 0,13$ sa intervalom pouzdanosti 0,11-0,15 (Slika 14B1). Na osnovu vrednosti $M=2,1$ izračunata su tri intenziteta efekta na sledeći način:

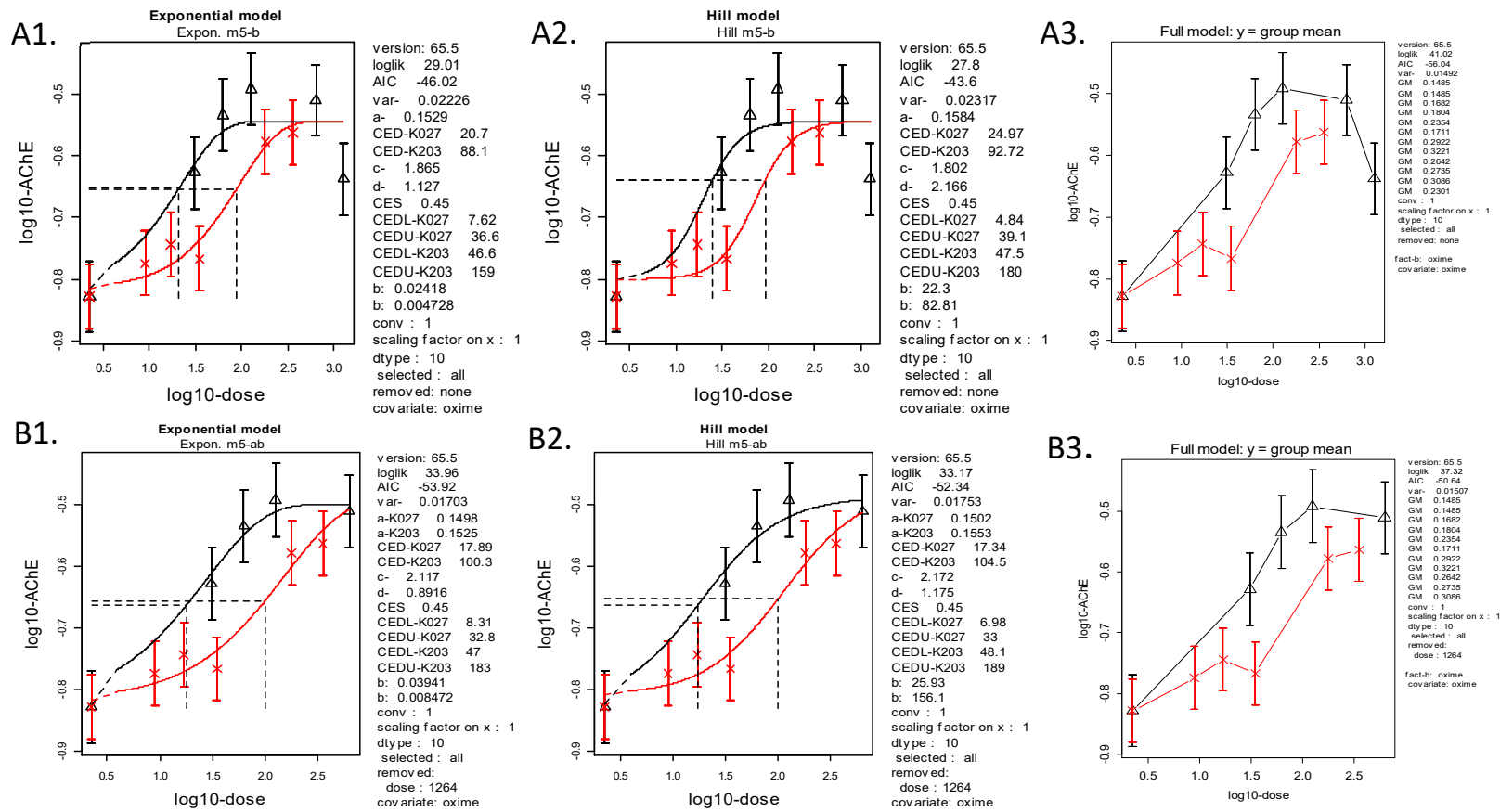
Jak efekat = $M^{1/2} = 2,1^{1/2} = 1,449$ puta povećanje efekta ili 45%,

Umeren efekat = $M^{1/4} = 2,1^{1/4} = 1,204$ puta povećanje efekta ili 20%,

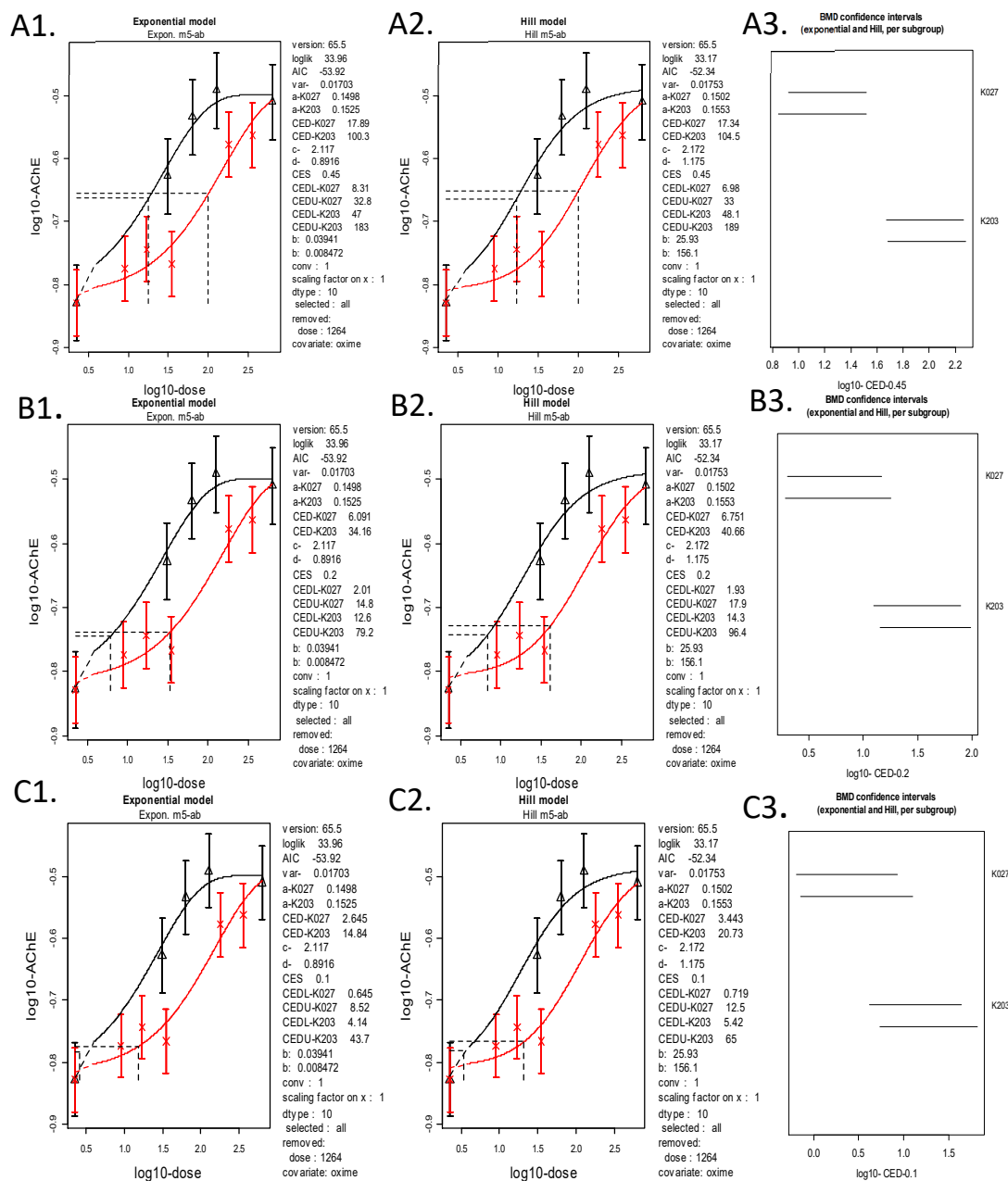
Slab efekat = $M^{1/8} = 2,1^{1/8} = 1,097$ puta povećanje efekta ili 10%.

Doze pri kojima oksimi K027 i K203 ostvaruju tri prethodno definisana intenziteta efekta reaktivacije AChE dijafragme 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 $CED_{10}=15$ $\mu\text{mol/kg}$ (Slika 15). Isti intenzitet efekta (bilo da se posmatra jak, umeren ili slab) reaktivacije AChE dijafragme se postiže nižom dozom oksima K027 u poređenju sa dozom oksima K203. Relativni faktor potentnosti (RPF) oksima K027 iznosi 5,103 (interval pouzdanosti 3,13-9,02) u odnosu na oksim K203 ($CED_{K203}=RPF \times CED_{K027}$) za reaktivaciju AChE inhibirane DDVP-om u dijafragmi (Slika 16). Pokazano je takođe da vrednost RPF ne zavisi od intenziteta efekta (ista vrednost RPF je dobijena pri sva tri intenziteta efekta CES=10%, 20% ili 45%), predstavljajući tako meru poređenja kompletnih krivih doza-efekat oksima K027 i K203 (Slika 16A-C). Ipak, skaliranje intervala pouzdanosti izračunatih CED se menja sa promenom intenziteta efekta (Slika 15A3-C3). Pri slabom intenzitetu efekta CED-intervali pouzdanosti, koji pripadaju oksimima K027 i K203 se znatno preklapaju, ukazujući da potentnost ne može biti statistički pouzdano razlikovana (Slika 15C3). Pri umerenom intenzitetu efekta gornja granica pouzdanosti CED oksima K027 se preklapa sa donjom granicom pouzdanosti CED oksima K203, ukazujući da razlika u potentnosti može biti veoma mala (Slika 15B3). Konačno, pri jakom intenzitetu efekta CED-intervali pouzdanosti se ne preklapaju dozvoljavajući statistički podržan rang veće potentnosti oksima K027 u poređenju sa oksimom K203 (Slika 15A3).

Preciznost u proceni CED, izražena kao odnos CED_U/CED_L , se povećava sa porastom intenziteta efekta (Tabela 8) rezultirajući faktorom 3,9 za oba oksima, pokazujući da je informativnost doza-efekat podataka dobra.



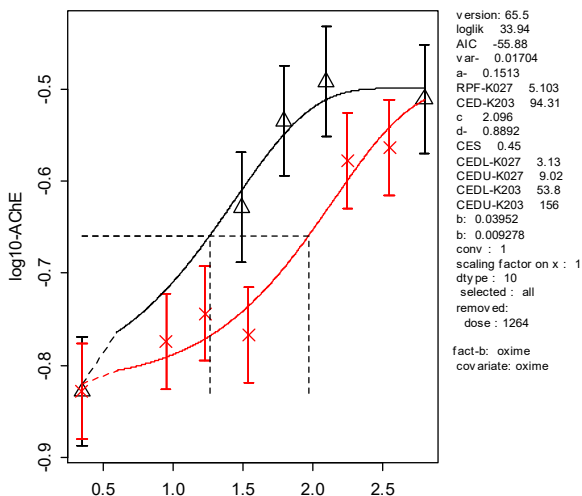
Slika 14. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) i aktivnosti AChE u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni model 5 (1), *Hill*-ov model 5 (2) i *full* model (3) sa (A) i bez (B) najviše dozne grupe oksima K027.



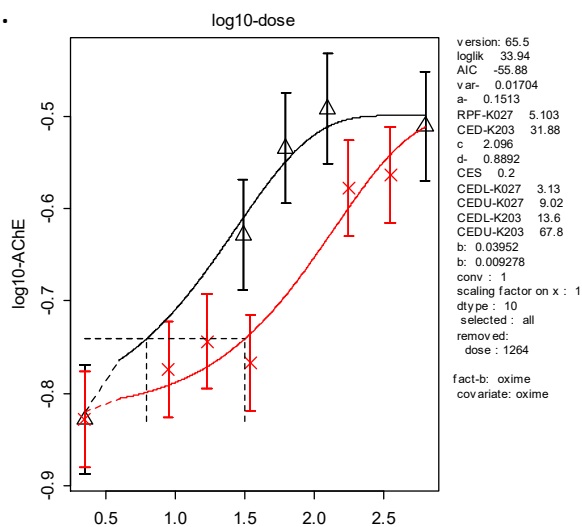
Slika 15. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) i aktivnosti AChE u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni (A1, B1, C1) i *Hill*-ov (A2, B2, C2) model 5. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju doze kritičnog efekta oksima (engl. *critical effect dose*, CED, $\mu\text{mol/kg}$) za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 45% (A), 20% (B) i 10% (C), redom. Na graficima označenim brojem 3 prikazani su 90% intervali pouzdanosti doze kritičnog efekta oksima K027 i K203 (za eksponencijalni i *Hill*-ov model) za tri intenziteta efekta (A3, B3 i C3).

E15 in terms of RPFs

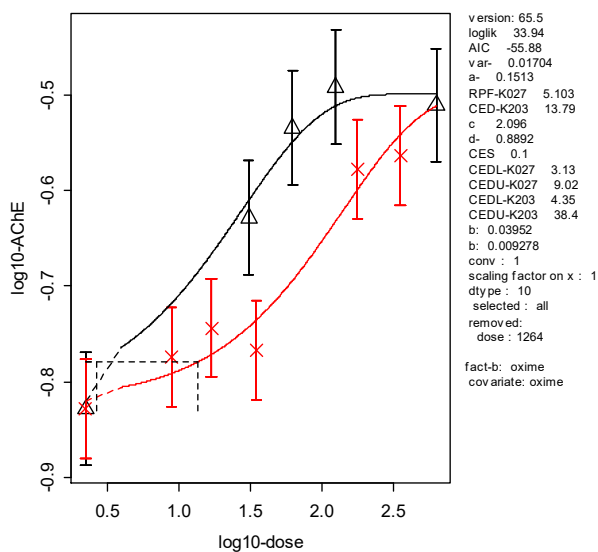
A.



B.



C.



Slika 16. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) i aktivnosti AChE u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju fitovan eksponencijalni model, koji uključuje izračunavanje relativnog faktora potentnosti (engl. *relative potency factor*, RPF) kao parametra modela. RPF izražava dozu kritičnog efekta (engl. *critical effect dose*, CED) oksima K027 u odnosu na CED oksima K203 (RPF>1, veća potentnost, manja CED). Vrednosti RPF-K027 (neimenovan broj), CED-K203 ($\mu\text{mol/kg}$) zajedno sa 90% intervalima pouzdanosti. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju RPF-K027 i CED-K203 za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 45% (A), 20% (B) i 10% (C).

Tabela 8. Doze kritičnog efekta ($\mu\text{mol/kg}$) oksima K027 i K203 sa 90% granicama pouzdanosti i mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) za tri intenziteta efekta reaktivacije AChE dijafragme

		Eksponecijalni model m5-ab		Hill-ov model m5-ab	
		K027	K203	K027	K203
CES=45%	CED	18	100	17	105
	CEDL	8	47	7	48
	CEDU	33	183	33	189
	CEDU/CEDL	3,9	3,9	4,7	3,9
CES=20%	CED	6	34	7	41
	CEDL	2	13	2	14
	CEDU	15	79	18	96
	CEDU/CEDL	7,4	6,3	9,3	6,7
CES=10%	CED	3	15	3	21
	CEDL	1	4	1	5
	CEDU	9	44	13	65
	CEDU/CEDL	13,2	10,6	17,4	12,0

CED - engl. *critical effect dose*; CEDL - engl. *lower, donja* i CEDU - engl. *upper, gornja* granica pouzdanosti CED; CES - engl. *critical effect size*.

Uz primenu 10 mg/kg atropina, model 5 iz ekponencijalne i *Hill*-ove familije modela bio je najbolja procena odnosa nivoa aktivnosti AChE dijafragme i šest doznih nivoa (uključujući nultu dozu) oksima K203 i K027 (Slika 17A). Međutim, slično nalazima u eritrocitima, nivo efekta dobijen pri najvišoj dozi oksima K027 je bitno odstupao od modela (kriva ne prolazi kroz interval pouzdanosti geometrijske sredine izmerenog efekta) (Slika 17A1-2). Posledično su dobijene vrednosti AIC parametra modela 5 ($AIC_{\text{exp}} = -29,14$, $AIC_{\text{Hill}} = -29,02$) bile za više od dve jedinice veće od AIC vrednosti tzv. *full* modela ($AIC_{\text{full}} = -48,22$) (Slika 17A3), pokazujući da nije zadovoljen kriterijum za postojanje dozno-zavisnog trenda. Stoga su podaci bili ponovo analizirani izostavljajući najvišu testiranu dozu oksima K027. Ovim su dobijeni značajno bolji modeli, međutim kriterijum za dozno zavisni trend je ispunio samo ekponencijalni model sa AIC vrednošću ($AIC_{\text{exp}} = -50,68$) (Slika 17B1) nižom od $AIC_{\text{full}} + 2$ ($AIC_{\text{full}} = -52,26$) (Slika 17B3), za razliku od *Hill*-ovog modela ($AIC_{\text{Hill}} = -48,64$) (Slika 17B2). Eksponecijalni model 5 (Slika 17B1) pokazuje značajnu razliku u parametru *b* dve krive doza-efekat koje odgovaraju oksimima K203 i K027 (eksponecijalni model: $b\text{-K203} + A = 0,00172$ i $b\text{-K027} + A = 0,007696$), ukazujući da se oksimi razlikuju u potentnosti da reaktiviraju DDVP-inhibiranu AChE dijafragme.

Maksimalna reaktivacija AChE dijafragme oksimima K203 i K027 primenjenih sa atropinom procenjena je na 2,3-puta, odnosno izraženo u % iznosi $(2,3-1) \times 100 = 130\%$, sa intervalom pouzdanosti 2,09-2,52, dok je vrednost standardne devijacije unutar grupe procenjena na $\sqrt{0,01873} = 0,137$ sa intervalom pouzdanosti 0,118-0,162 (Slika 17B1-2). Uzimajući u obzir intervale pouzdanosti dobijena kombinacija vrednosti M i s najbliže odgovara kombinaciji $M=2,5$ i $s=0,131$, utvrđenoj od strane Wout Slob-a (2017) kao kvantitativan odnos između M i s . Stoga je vrednost $M=2,5$ odabrana kao reprezentativna maksimalna veličina efekta reaktivacije AChE dijafragme oksimima K203 i K027 uz primenu atropina i izračunata su tri intenziteta efekta na sledeći način:

Jak efekat = $M^{1/2} = 2,5^{1/2} = 1,581$ puta povećanje efekta ili 58%,

Umeren efekat = $M^{1/4} = 2,5^{1/4} = 1,257$ puta povećanje efekta ili 26%,

Slab efekat = $M^{1/8} = 2,5^{1/8} = 1,121$ puta povećanje efekta ili 12%.

Doze pri kojima oksimi K027 i K203 uz primenu atropina ostvaruju prethodno definisana tri intenziteta reaktivacije AChE dijafragme su: za oksim K027 $CE_{58}=31 \mu\text{mol/kg}$, $CE_{26}=14 \mu\text{mol/kg}$ i $CE_{12}=7 \mu\text{mol/kg}$, a za oksim K203 $CE_{58}=100 \mu\text{mol/kg}$, $CE_{26}=46 \mu\text{mol/kg}$ i $CE_{12}=24 \mu\text{mol/kg}$ (Slika 18). Isti intenzitet efekta (bilo da se posmatra jak, umeren ili slab) reaktivacije AChE dijafragme se postiže nižom dozom oksima K027 u poređenju sa dozom oksima K203, primenjenih sa atropinom. Primenjen sa atropinom oksim K027 pokazuje 3,245 (interval pouzdanosti 2,22-4,62) puta veću potentnost (odnosno nižu dozu) u odnosu na oksim K203 ($CE_{K203} = RPF \times CE_{K027}$) za reaktivaciju AChE inhibirane DDVP-om u dijafragmi (Slika 19). Pokazano je takođe da vrednost RPF ne zavisi od intenziteta efekta (ista vrednost RPF je dobijena pri sva tri intenziteta efekta $CE=12\%$, 26% ili 58%), predstavljajući tako meru poređenja kompletnih krivih doza-efekat oksima K027 i K203 (Slika 19). Ipak, skaliranje intervala pouzdanosti izračunatih CED se menja sa promenom intenziteta efekta (Slika 18A2-C2). Pri slabom efektu gornja granica pouzdanosti CED oksima K027 se dodiruje sa donjom granicom pouzdanosti CED oksima K203, ukazujući da razlika u potentnosti može biti veoma mala (Slika 18C2). Međutim, i pri umerenom i jakom efektu CED-intervali pouzdanosti se ne preklapaju dozvoljavajući statistički podržan rang veće

potentnosti oksima K027 u poređenju sa oksimom K203 pri primeni i atropina (Slika 18A-B2).

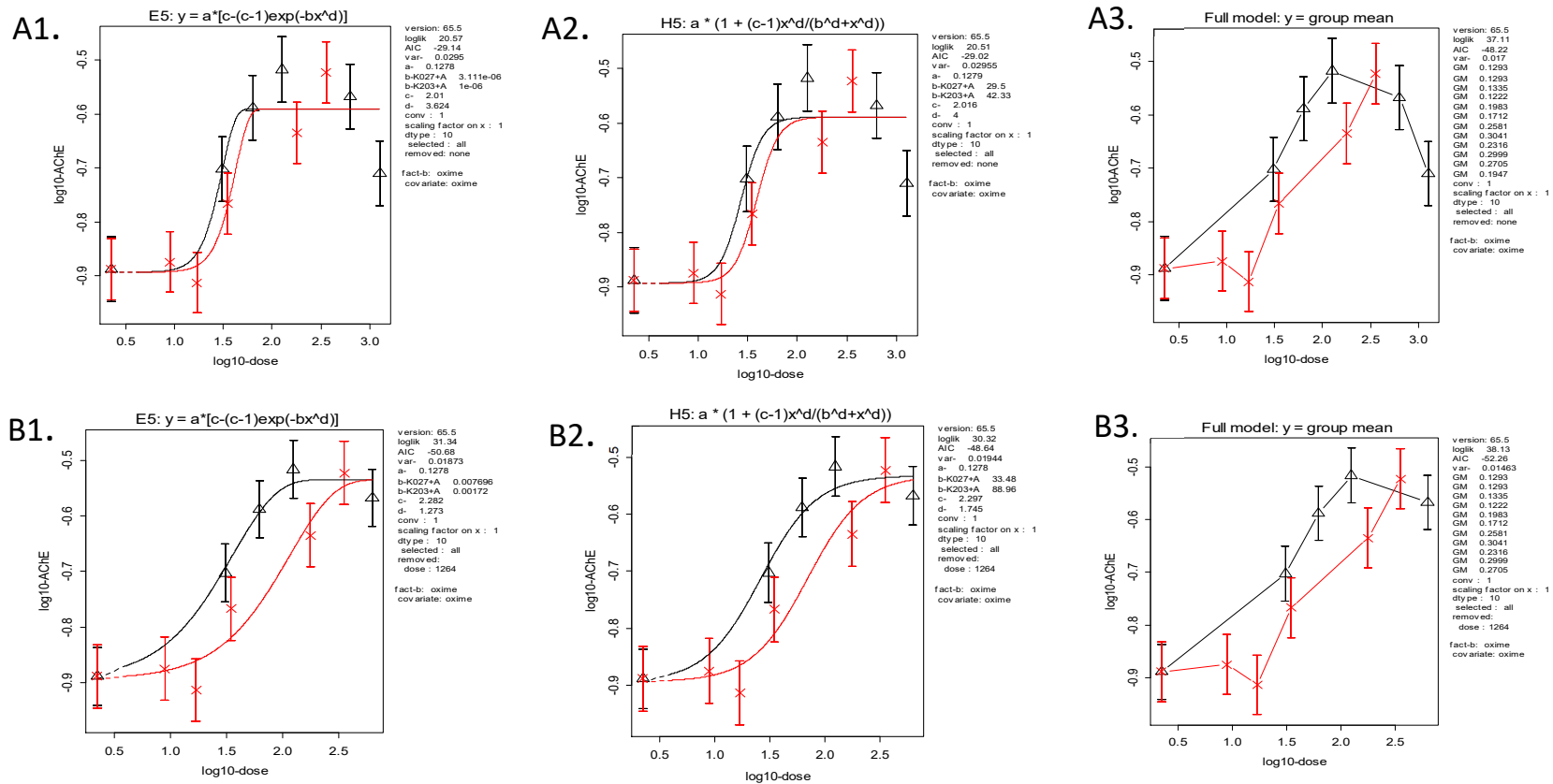
Preciznost u proceni CED oksima primenjenih sa atropinom, izražena kao odnos CEDU/CEDL, se povećava sa porastom intenziteta efekta (Tabela 9) rezultirajući faktorima 1,9 i 2,2 za oksim K027 i K203, redom pokazujući da je informativnost doza-efekat podataka dobra.

Tabela 9. Doze kritičnog efekta ($\mu\text{mol/kg}$) oksima K027 i K203 primenjenih sa atropinom (A) sa 90% granicama pouzdanosti i mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) za tri intenziteta efekta reaktivacije AChE dijafragme

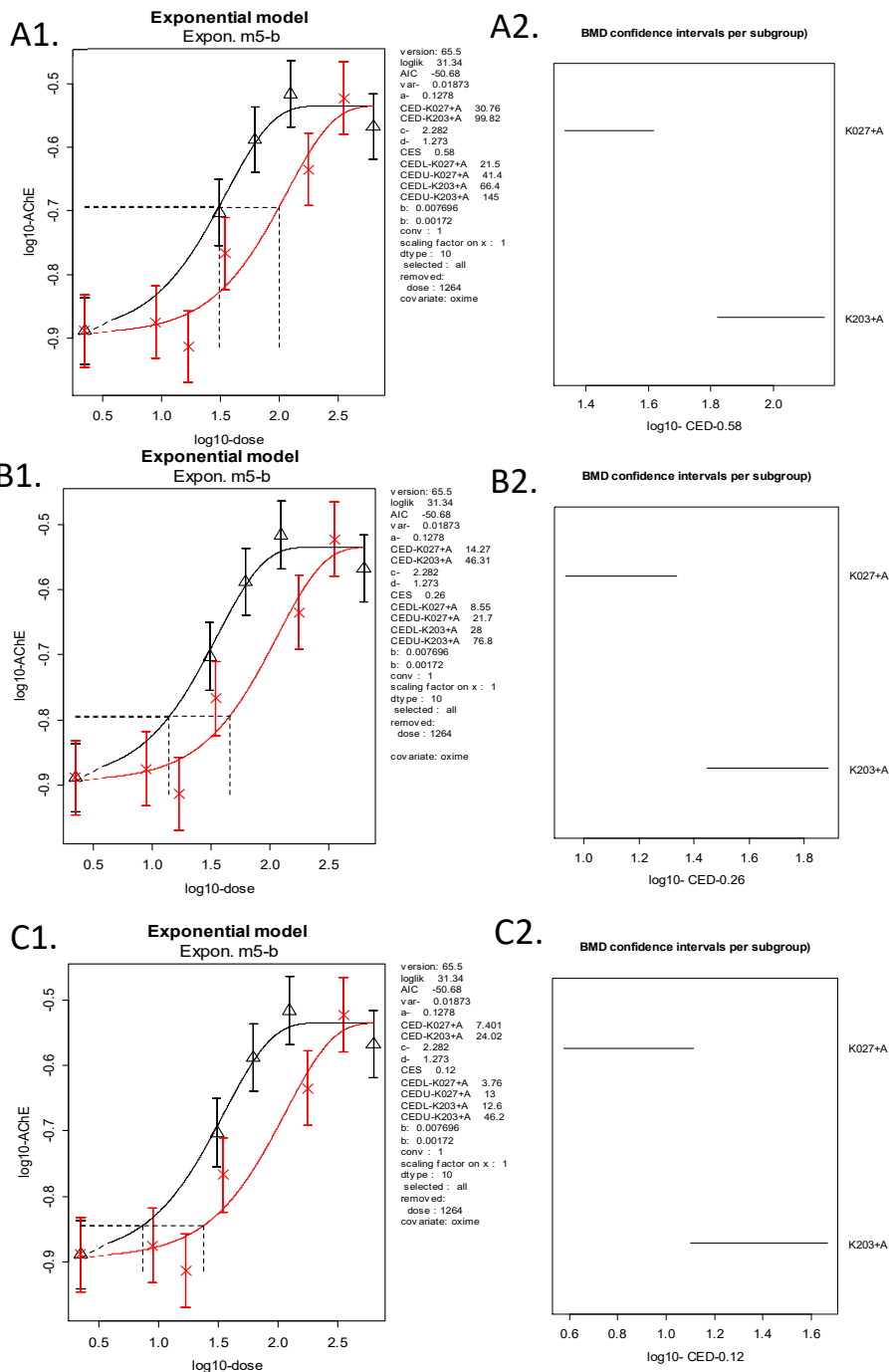
		Eksponecijalni model m5-b	
		K027+A	K203+A
CES=58%	CED	31	100
	CEDL	22	66
	CEDU	41	145
	CEDU/CEDL	1,9	2,2
CES=26%	CED	14	46
	CEDL	9	28
	CEDU	22	77
	CEDU/CEDL	2,5	2,7
CES=12%	CED	7	24
	CEDL	4	13
	CEDU	13	46
	CEDU/CEDL	3,5	3,7

CED - engl. *critical effect dose*; CEDL - engl. *lower, donja* i CEDU - engl. *upper, gornja* granica pouzdanosti CED; CES - engl. *critical effect size*.

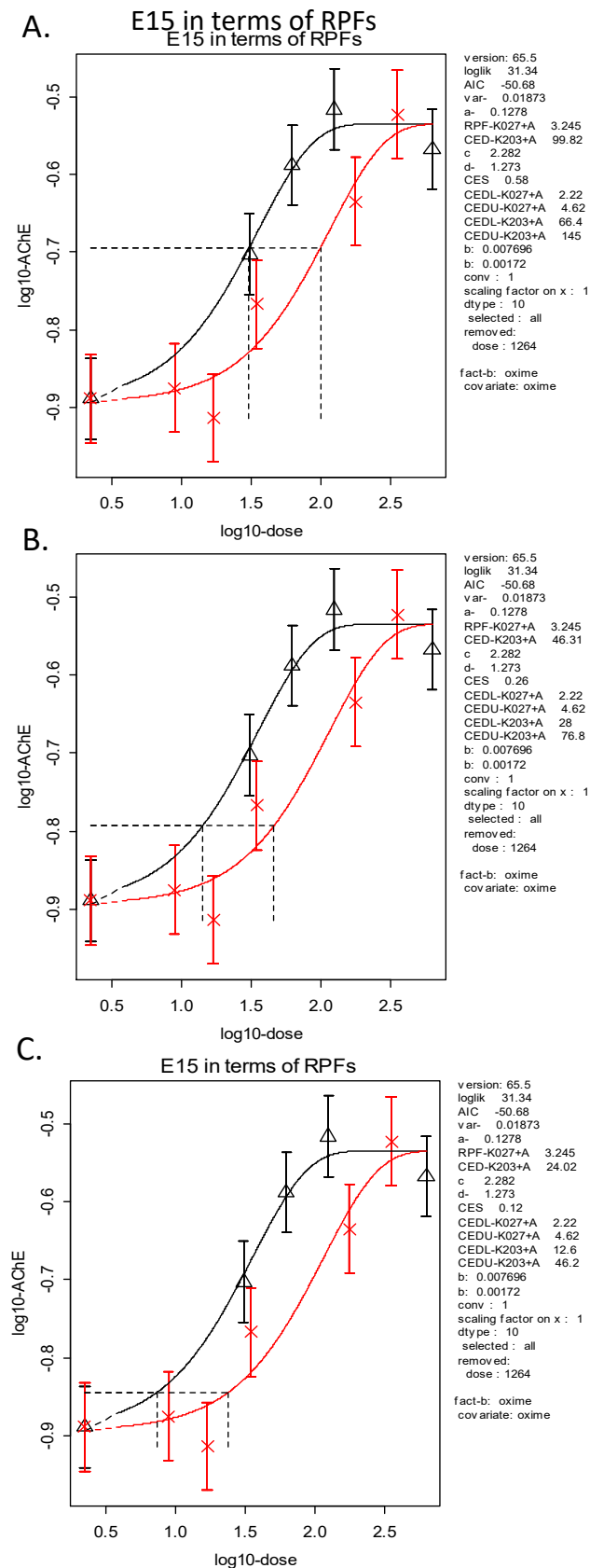
Promena reaktivacije AChE dijafragme u funkciji doze K-oksima, izražena kroz odnos $\text{CED}_{\text{jak}}/\text{CED}_{\text{umeren}}$, bila je jednaka faktoru 3,0 (90% granice pouzdanosti 2,2-4,1), odnosno faktoru 2,2 (90% granice pouzdanosti 1,9-2,5) kada su K-oksimi primenjeni sa atropinom.



Slika 17. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) primenjenih sa atropinom (A) i aktivnosti AChE u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni model 5 (1), *Hill*-ov model 5 (2) i *full* model (3) sa (A) i bez (B) najviše dozne grupe oksima K027.



Slika 18. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) primenjenih sa atropinom (A) i aktivnosti AChE u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni (A1) model. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju doze kritičnog efekta oksima (engl. *critical effect dose*, CED, $\mu\text{mol/kg}$) za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 45% (A), 20% (B) i 10% (C). Na graficima označenim brojem 2 prikazani su 90% intervali pouzdanosti doze kritičnog efekta oksima K027 i K203 (za eksponencijalni i *Hill*-ov model) za tri intenziteta efekta (A2, B2 i C2).



Slika 19. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) primenjenih sa atropinom (A) i aktivnosti AChE u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju fitovan eksponencijalni model, koji uključuje izračunavanje relativnog faktora potentnosti (engl. *relative potency factor*, RPF) kao parametra modela. RPF izražava dozu kritičnog efekta (engl. *critical effect dose*, CED) oksima K027 u odnosu na CED oksima K203 (RPF>1, veća potentnost, manja CED). Vrednosti RPF-K027 (neimenovan broj), CED-K203 ($\mu\text{mol/kg}$) zajedno sa 90% intervalima pouzdanosti. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju RPF-K027 i CED-K203 za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 45% (A), 20% (B) i 10% (C).

4.4.3. Model dozne zavisnosti efekta reaktivacije acetilholinesteraze mozga

Model 5 iz eksponencijalne i *Hill*-ove familije modela bio je najbolja procena odnosa nivoa aktivnosti AChE mozga i šest doznih nivoa (uključujući nultu dozu) oksima K203 i K027 (Slika 20A). Međutim, slično nalazima u eritrocitima i dijafragmi, nivo efekta dobijen pri najvišoj dozi oksima K027, ali sada i oksima K203, je bitno odstupao od modela (kriva ne prolazi kroz interval pouzdanosti geometrijske sredine izmerenog efekta) (Slika 20A1-2). Posledično su dobijene vrednosti AIC parametra modela 5 ($AIC_{exp} = -95,3$, $AIC_{Hill} = -94,84$) bile za više od dve jedinice veće od AIC vrednosti tzv. *full* modela ($AIC_{full} = -150,86$) (Slika 20A3), pokazujući da nije zadovoljen kriterijum za postojanje dozno-zavisnog trenda. Stoga su podaci bili ponovo analizirani izostavljajući najvišu testiranu dozu oksima K027 i oksima K203. Ovim je dobijen značajno bolji model 5 (Slika 20B) koji ispunjava kriterijum za dozno-zavisni trend sa AIC vrednostima ($AIC_{exp} = -123,44$, $AIC_{Hill} = -124,24$) nižim od vrednosti tzv. *full* modela ($AIC_{full} = -119,82$). Ovaj model pokazuje značajnu razliku u parametru *b* dve krive doza-efekat koje odgovaraju oksimima K203 i K027 (eksponencijalni model: $b\text{-K203} = 7,904e-05$ i $b\text{-K027} = 2,638e-04$), ukazujući da se oksimi razlikuju u potentnosti da reaktiviraju DDVP-inhibiranu AChE mozga.

Iz praktičnog razloga lakšeg praćenja dobijenih rezultata analize, kao i nepostojanja značajne razlike u rezultatima analize eksponencijalnim i *Hill*-ovim modelom, u daljem tekstu su navedeni rezultati analize eksponencijalnim modelom, dok su na slikama prikazani rezultati analiza obe familije modela.

Maksimalna reaktivacija AChE mozga oksimima procenjena je na 1,4-puta, odnosno izraženo u % iznosi $(1,4-1) \times 100 = 40\%$, dok je vrednost standardne devijacije unutar grupe procenjena na $\sqrt{0,0039} = 0,062$ (Slika 20B1). Uzimajući u obzir intervale pouzdanosti dobijena kombinacija vrednosti *M* (1,34-1,50) i *s* (0,053-0,074) najbliže odgovara kombinaciji $M=1,5$ i $s=0,058$, utvrđenoj od strane Wout Slob-a (2017) kao kvantitativan odnos između *M* i *s*. Stoga je vrednost $M=1,5$ odabrana kao reprezentativna maksimalna veličina efekta reaktivacije AChE mozga

oksimima K203 i K027 za dobijeni set podataka u ovom eksperimentu i izračunata su tri intenziteta efekta na sledeći način:

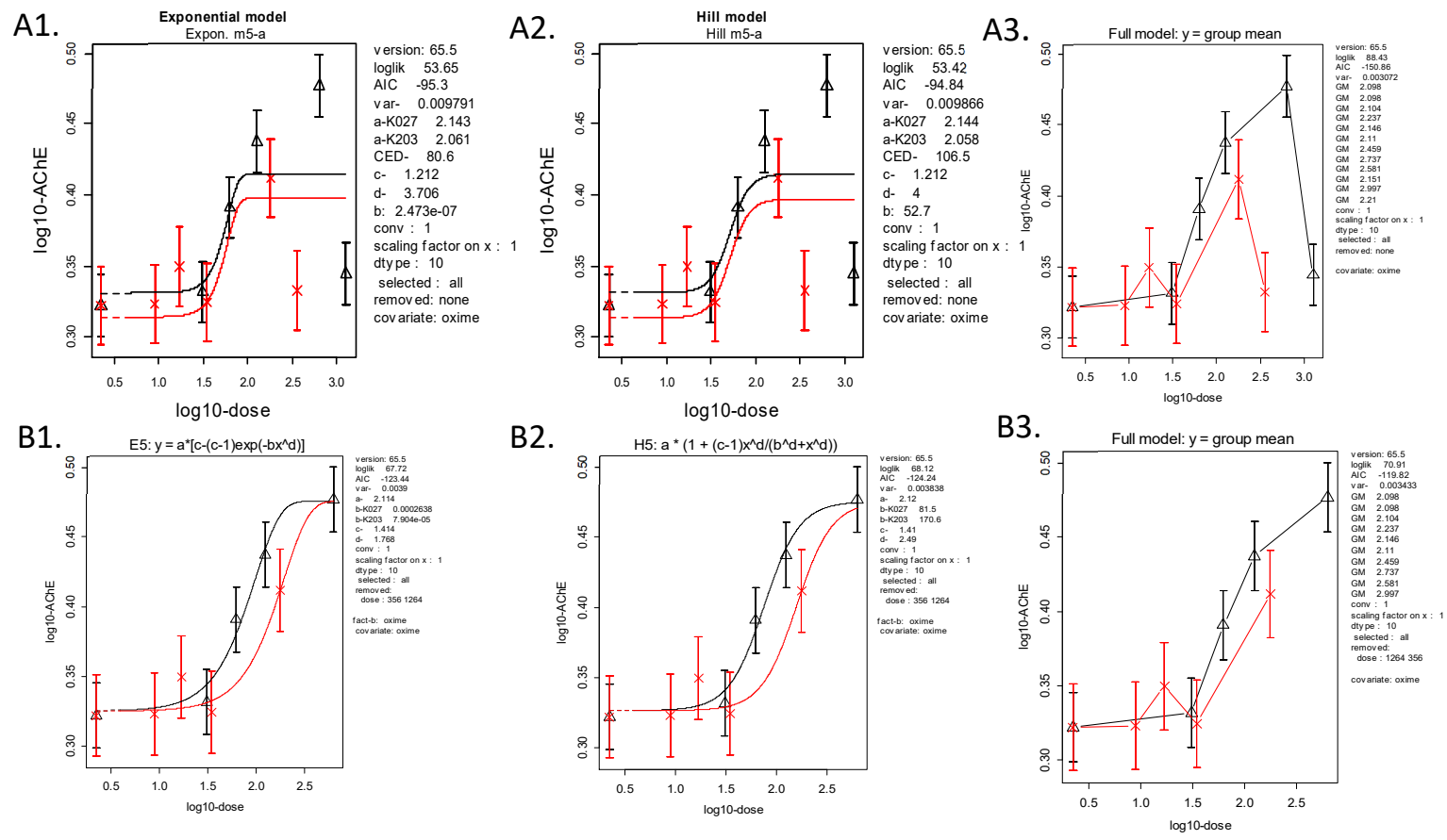
Jak efekat = $M^{1/2} = 1,5^{1/2} = 1,225$ puta povećanje efekta ili 22%,

Umeren efekat = $M^{1/4} = 1,5^{1/4} = 1,107$ puta povećanje efekta ili 11%,

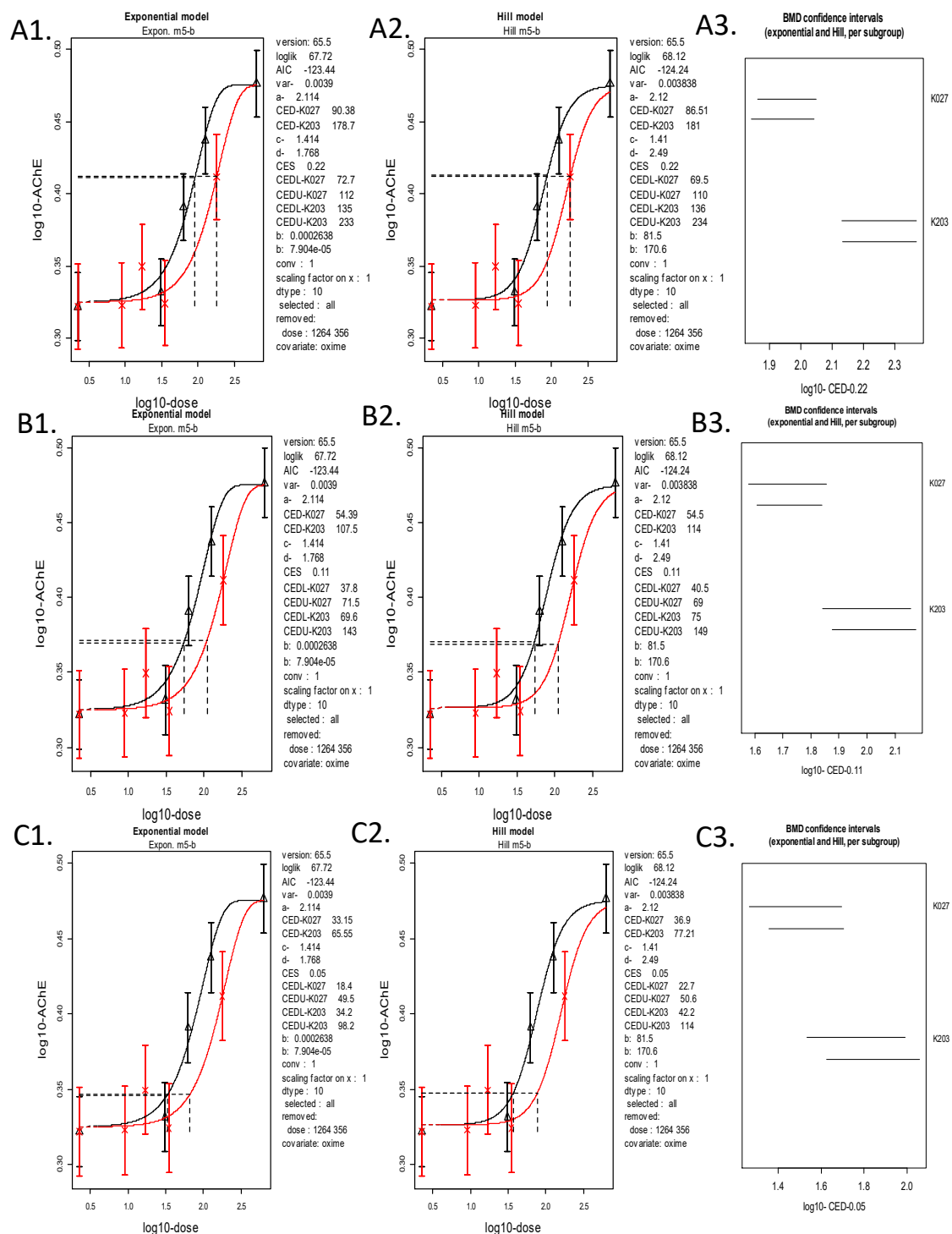
Slab efekat = $M^{1/8} = 1,5^{1/8} = 1,052$ puta povećanje efekta ili 5%.

Doze pri kojima oksimi K027 i K203 ostvaruju prethodno definisane intenzitete efekta reaktivacije AChE mozga 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 $CED_5=66$ $\mu\text{mol/kg}$ (Slika 21). Isti intenzitet efekta (bilo da se posmatra jak, umeren ili slab) se postiže nižom dozom oksima K027 u poređenju sa dozom oksima K203, pokazujući veću reaktivatorsku potentnost oksima K027 u mozgu. Oksim K027 pokazuje 1,977 (interval pouzdanosti 1,47-2,64) puta veću potentnost (odnosno nižu dozu) u odnosu na oksim K203 ($CED_{K203}=RPF \times CED_{K027}$) za reaktivaciju AChE inhibirane DDVP-om u mozgu (Slika 22). Pokazano je takođe da je vrednost RPF nezavisna od intenziteta efekta (ista vrednost RPF je dobijena pri sva tri intenziteta efekta CES=5%, 11% ili 22%), predstavljajući tako meru poređenja kompletnih krivih doza-efekat oksima K027 i K203. Ipak, skaliranje intervala pouzdanosti izračunatih CED se menja sa promenom intenziteta efekta (Slika 21A3-C3). Pri slabom efektu CED-intervali pouzdanosti, koji pripadaju oksimima K027 i K203 se znatno preklapaju, ukazujući da potentnost ne može biti statistički pouzdano razlikovana (Slika 21C3). Pri umerenom efektu gornja granica pouzdanosti CED oksima K027 se preklapa sa donjom granicom pouzdanosti CED oksima K203, ukazujući da razlika u potentnosti može biti veoma mala (Slika 21B3). Konačno, pri jakom efektu CED-intervali pouzdanosti se ne preklapaju dozvoljavajući statistički podržan rang veće potentnosti oksima K027 u poređenju sa oksimom K203 (Slika 21A3).

Preciznost u proceni CED, izražena kao odnos CED_U/CED_L , se povećava sa porastom intenziteta efekta (Tabela 10) rezultirajući faktorima 1,5 i 1,7 za oksim K027 i K203, redom, pokazujući da je informativnost doza-efekat podataka prilično dobra.

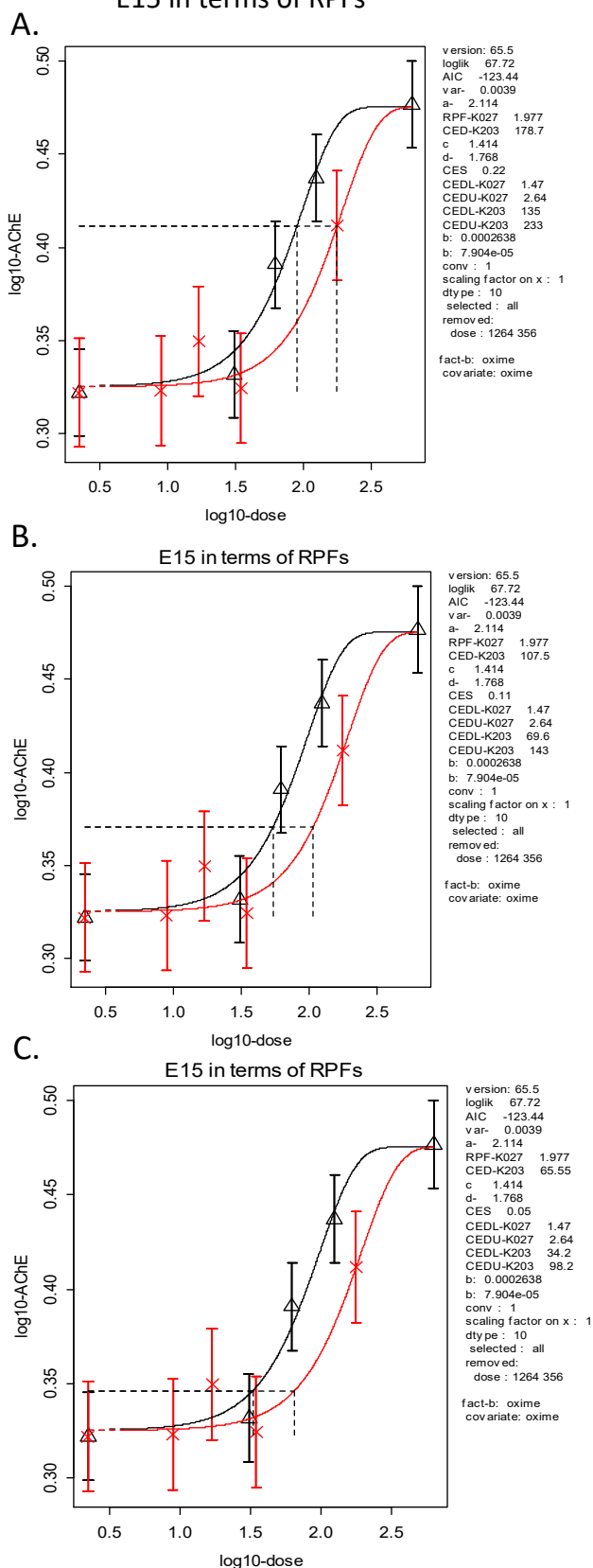


Slika 20. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) i aktivnosti AChE u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni model 5 (1), *Hill*-ov model 5 (2) i *full* model (3) sa (A) i bez (B) najviših doznih grupa oksima K027 i K203.



Slika 21. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) i aktivnosti AChE u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni (A1, B1, C1) i *Hill*-ov (A2, B2, C2) model 5. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju doze kritičnog efekta oksima (engl. *critical effect dose*, CED, $\mu\text{mol/kg}$) za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 22% (A), 11% (B) i 5% (C). Na graficima označenim brojem 3 prikazani su 90% intervali pouzdanosti doze kritičnog efekta oksima K027 i K203 (za eksponencijalni i *Hill*-ov model) za tri intenziteta efekta (A3, B3 i C3).

E15 in terms of RPFs



Slika 22. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) i aktivnosti AChE u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju fitovan eksponencijalni model, koji uključuje izračunavanje relativnog faktora potentnosti (engl. *relative potency factor*, RPF) kao parametra modela. RPF izražava dozu kritičnog efekta (engl. *critical effect dose*, CED) oksima K027 u odnosu na CED oksima K203 (RPF>1, veća potentnost, manja CED). Vrednosti RPF-K027 (neimenovan broj), CED-K203 (μmol/kg) zajedno sa 90% intervalima pouzdanosti. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju RPF-K027 i CED-K203 za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 22% (A), 11% (B) i 5% (C).

Tabela 10. Doze kritičnog efekta ($\mu\text{mol/kg}$) oksima K027 i K203 sa 90% granicama pouzdanosti i mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) za tri intenziteta efekta reaktivacije AChE mozga

		Eksponecijalni model m5-b		Hill-ov model m5-b	
		K027	K203	K027	K203
CES=22%	CED	90	179	87	181
	CEDL	73	135	70	136
	CEDU	112	233	110	234
	CEDU/CEDL	1,5	1,7	1,6	1,7
CES=11%	CED	54	108	55	114
	CEDL	38	70	41	75
	CEDU	72	143	69	149
	CEDU/CEDL	1,9	2,1	1,7	2,0
CES=5%	CED	33	66	37	77
	CEDL	18	34	23	42
	CEDU	50	98	51	144
	CEDU/CEDL	2,7	2,9	2,2	3,4

CED - engl. *critical effect dose*; CEDL - engl. *lower, donja* i CEDU - engl. *upper, gornja* granica pouzdanosti CED; CES - engl. *critical effect size*.

Kada su rastuće doze oksima K203 i K027 date uz 10 mg/kg atropina kod pacova trovanih DDVP-om dobijen je model 5 iz ekspancijalne i Hill-ove familije modela, kao najbolja procena odnosa nivoa aktivnosti AChE mozga i doza K-oksima (Slika 23A). Međutim, slično nalazima u eritrocitima i dijafragmi, nivo efekta dobijen pri najvišoj dozi oksima K027, ali sada i oksima K203, je bitno odstupao od modela (kriva ne prolazi kroz interval pouzdanosti geometrijske sredine izmerenog efekta) (Slika 23A1-2). Posledično su dobijene vrednosti AIC parametra modela 5 ($AIC_{\text{exp}} = -86$, $AIC_{\text{Hill}} = -85,94$) bile za više od dve jedinice veće od AIC vrednosti tzv. *full* modela ($AIC_{\text{full}} = -143,94$) (Slika 23A3), pokazujući da nije zadovoljen kriterijum za postojanje dozno-zavisnog trenda. Stoga su podaci bili ponovo analizirani izostavljajući najvišu testiranu dozu oksima K027 i oksima K203. Ovim je dobijen značajno bolji model 5 koji ispunjava kriterijum za dozno-zavisni trend sa AIC vrednostima ($AIC_{\text{exp}} = -121,34$, $AIC_{\text{Hill}} = -121,94$) (Slika 23B1-2) nižim od vrednosti tzv. *full* modela ($AIC_{\text{full}} = -118,86$) (Slika 23B3). Ovaj model pokazuje značajnu razliku u parametru b dve krive doza-efekat koje odgovaraju oksimima K203 i K027 (ekspancijalni model: $b\text{-K203} = 2,333\text{e-}04$ i $b\text{-K027} = 6,296\text{e-}04$), ukazujući da se

oksimi i kada su primenjeni sa atropinom razlikuju u potentnosti da reaktiviraju DDVP-inhibiranu AChE mozga.

Iz praktičnog razloga lakšeg praćenja dobijenih rezultata analize, kao i nepostojanja značajne razlike u rezultatima analize eksponencijalnim i *Hill*-ovim modelom, u daljem tekstu su navedeni rezultati analize eksponencijalnim modelom, dok su na slikama prikazani rezultati analiza obe familije modela.

Maksimalna reaktivacija AChE mozga oksimima K203 i K027 pri primeni atropina procenjena je na 1,4-puta, odnosno izraženo u % iznosi $(1,4-1) \times 100 = 40\%$, dok je vrednost standardne devijacije unutar grupe procenjena na $\sqrt{0,0041} = 0,0640$ (Slika 23B1). Uzimajući u obzir intervale pouzdanosti dobijena kombinacija vrednosti M (1,37-1,5) i s (0,0546-0,0759) najbliže odgovara kombinaciji $M=1,5$ i $s=0,058$, utvrđenoj od strane Wout Slob-a (2017) kao kvantitativan odnos između M i s . Stoga je vrednost $M=1,5$ odabrana kao reprezentativna maksimalna veličina efekta reaktivacije AChE mozga oksimima K203 i K027 pri primeni atropina za dobijeni set podataka i izračunata su tri intenziteta efekta na sledeći način:

Jak efekat = $M^{1/2} = 1,5^{1/2} = 1,225$ puta povećanje efekta ili 22%,

Umeren efekat = $M^{1/4} = 1,5^{1/4} = 1,107$ puta povećanje efekta ili 11%,

Slab efekat = $M^{1/8} = 1,5^{1/8} = 1,052$ puta povećanje efekta ili 5%.

Doze pri kojima oksimi K027 i K203 uz promenu atropina ostvaruju prethodno definisane intenzitete efekta reaktivacije AChE mozga su: za oksim K027 $CED_{22}=70 \mu\text{mol/kg}$, $CED_{11}=41 \mu\text{mol/kg}$ i $CED_5=24 \mu\text{mol/kg}$, a za oksim K203 $CED_{22}=129 \mu\text{mol/kg}$, $CED_{11}=76 \mu\text{mol/kg}$ i $CED_5=45 \mu\text{mol/kg}$ (Slika 24). Isti intenzitet efekta (bilo da se posmatra jak, umeren ili slab) se postiže nižom dozom oksima K027 u poređenju sa dozom oksima K203, pokazujući veću reaktivatorsku potentnost oksima K027 u mozgu. Oksim K027 pokazuje 1,834 (interval pouzdanosti 1,38-2,44) puta veću potentnost (odnosno nižu dozu) u odnosu na oksim K203 ($CED_{K203} = RPF \times CED_{K027}$) za reaktivaciju AChE inhibirane DDVP-om u mozgu pri primeni atropina (Slika 25). Ipak, skaliranje intervala pouzdanosti izračunatih CED se menja sa promenom intenziteta efekta (Slika 24A3-C3). Pri slabom intenzitetu efekta CED-intervali pouzdanosti, koji pripadaju oksimima K027 i K203 se znatno preklapaju, ukazujući da potentnost ne može biti statistički pouzdano razlikovana (Slika 24C3). Pri umerenom intenzitetu efekta gornja granica

pouzdanosti CED oksima K027 se preklapa sa donjom granicom pouzdanosti CED oksima K203, ukazujući da razlika u potentnosti može biti veoma mala (Slika 24B3). Konačno, pri jakom intenzitetu efekta CED-intervali pouzdanosti se ne preklapaju dozvoljavajući statistički podržan rang veće potentnosti oksima K027 u poređenju sa oksimom K203 (Slika 24A3).

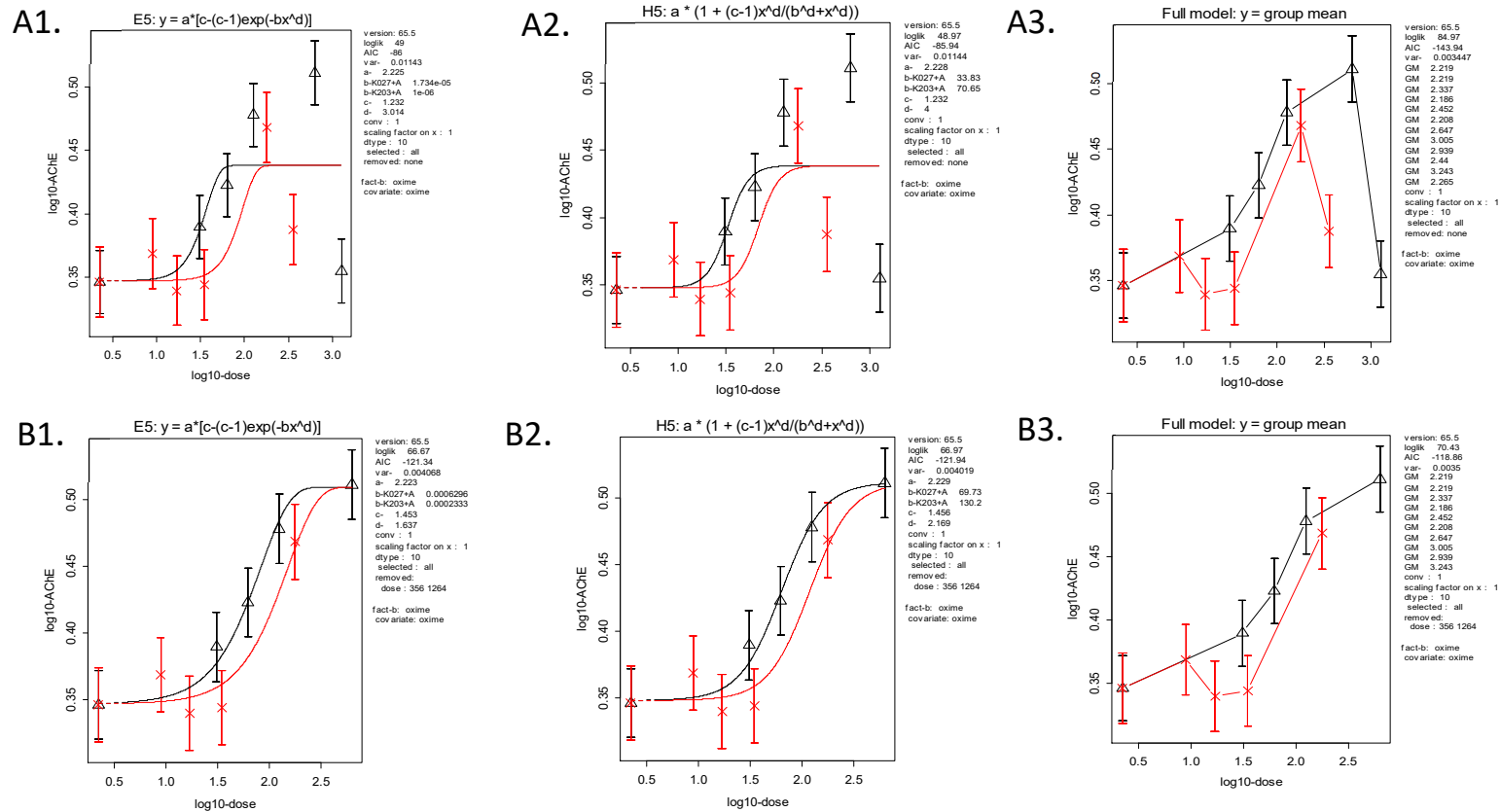
Preciznost u proceni CED, izražena kao odnos CEDU/CEDL, se povećava sa porastom intenziteta efekta (Tabela 11) rezultirajući faktorima 1,5 i 1,7 za oksim K027 i K203, redom, pokazujući da je informativnost doza-efekat podataka prilično dobra.

Tabela 11. Doze kritičnog efekta ($\mu\text{mol/kg}$) oksima K027 i K203 primenjenih sa atropinom (A) sa 90% granicama pouzdanosti i mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) za tri intenziteta efekta reaktivacije AChE mozga

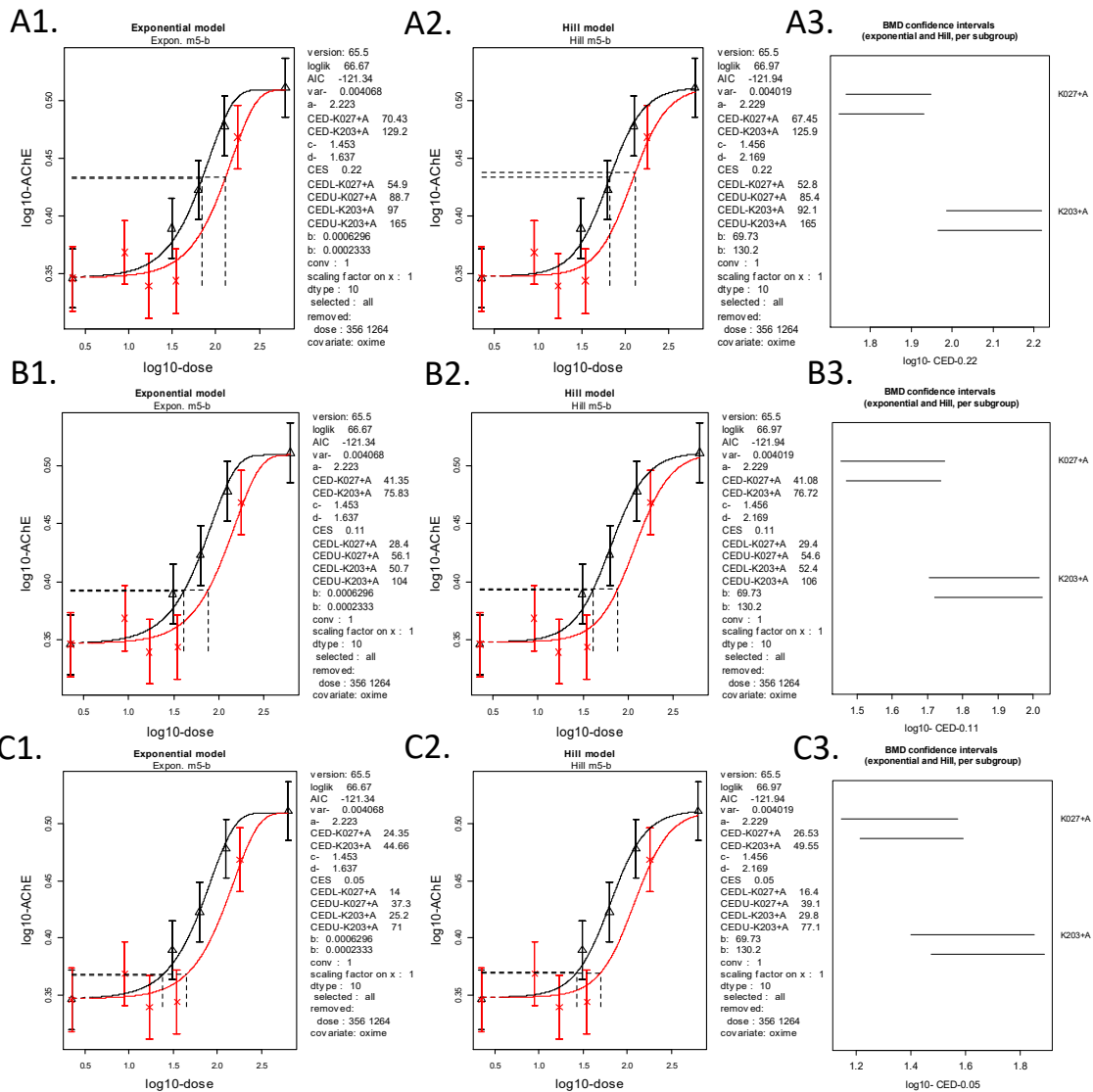
		Eksponecijalni model m5-b		Hill-ov model m5-b	
		K027+A	K203+A	K027+A	K203+A
CES=22%	CED	70	129	67	126
	CEDL	55	97	53	92
	CEDU	89	165	85	165
	CEDU/CEDL	1,6	1,7	1,6	1,8
CES=11%	CED	41	76	41	77
	CEDL	28	51	29	52
	CEDU	56	104	55	106
	CEDU/CEDL	1,9	2,0	1,9	2,0
CES=5%	CED	24	45	27	50
	CEDL	14	25	16	30
	CEDU	37	71	39	77
	CEDU/CEDL	2,7	2,8	2,4	2,6

CED - engl. *critical effect dose*; CEDL - engl. *lower*, donja i CEDU - engl. *upper*, gornja granica pouzdanosti CED; CES - engl. *critical effect size*.

Promena reaktivacije AChE mozga u funkciji doze K-oksima, izražena kroz odnos $\text{CED}_{\text{jak}}/\text{CED}_{\text{umeren}}$, bila je jednaka faktoru 1,7 (90% granice pouzdanosti 1,6-1,9) kada su K-oksimi primenjeni bez i sa atropinom.

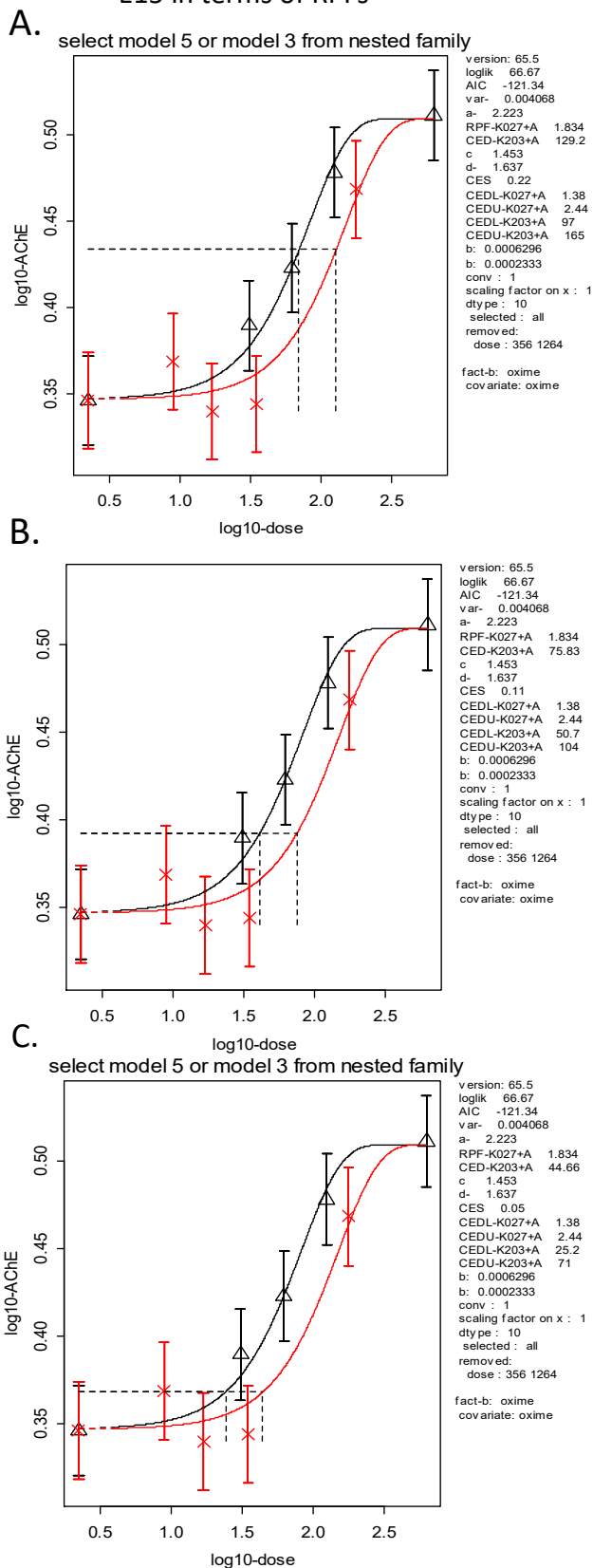


Slika 23. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) primenjenih sa atropinom (A) i aktivnosti AChE u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni model 5 (1), *Hill*-ov model 5 (2) i *full* model (3) sa (A) i bez (B) najviših doznih grupa oksima K027 i K203.



Slika 24. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) primenjenih sa atropinom (A) i aktivnosti AChE u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni (A1, B1, C1) i *Hill*-ov (A2, B2, C2) model 5. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju doze kritičnog efekta oksima (engl. *critical effect dose*, CED, $\mu\text{mol/kg}$) za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 22% (A), 11% (B) i 5% (C). Na graficima označenim brojem 3 prikazani su 90% intervali pouzdanosti doze kritičnog efekta oksima K027 i K203 (za eksponencijalni i *Hill*-ov model) za tri intenziteta efekta (A3, B3 i C3).

E15 in terms of RPFs



Slika 25. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) primenjenih sa atropinom (A) i aktivnosti AChE u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju fitovan eksponencijalni model, koji uključuje izračunavanje relativnog faktora potentnosti (engl. *relative potency factor*, RPF) kao parametra modela. RPF izražava dozu kritičnog efekta (engl. *critical effect dose*, CED) oksima K027 u odnosu na CED oksima K203 (RPF>1, veća potentnost, manja CED). Vrednosti RPF-K027 (neimenovan broj), CED-K203 ($\mu\text{mol/kg}$) zajedno sa 90% intervalima pouzdanosti. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju RPF-K027 i CED-K203 za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 22% (A), 11% (B) i 5% (C).

4.4.4. Model dozne zavisnosti efekta reaktivacije butirilholinesteraze plazme

Aktivnost BuChE u plazmi kao funkcija šest rastućih doza oksima K027 i oksima K203 je opisana modelom 3 iz obe familije modela, eksponencijalne i *Hill*-ove, koji ispunjava kriterijum za dozno-zavisni trend sa AIC vrednostima ($AIC_{exp} = -111,54$, $AIC_{Hill} = -111,96$) nižim od vrednosti tzv. *full* modela ($AIC_{full} = -110,84$) (Slika 26A1-3). Ovaj model pokazuje razliku u parametru b dve krive doza-efekat koje odgovaraju oksimima K203 i K027 (eksponencijalni model: $b\text{-K203} = 0,03826$ i $b\text{-K027} = 0,05062$), ukazujući da se oksimi razlikuju u potentnosti da reaktiviraju DDVP-inhibiranu BuChE plazme. Sa druge strane, ovaj troparametarski model nije omogućio procenjivanje parametra c , maksimalnog efekta reaktivacije BuChE plazme oksimima K203 i K027.

Iz praktičnog razloga lakšeg praćenja dobijenih rezultata analize, kao i nepostojanja značajne razlike u rezultatima analize eksponencijalnim i *Hill*-ovim modelom, u daljem tekstu su navedeni rezultati analize eksponencijalnim modelom, dok su na slikama prikazani rezultati analiza obe familije modela.

Vrednost varijanse troparametarskog eksponencijalnog modela zavisnosti aktivnosti BuChE plazme od doze oksima K203 i K027 iznosila je 0,077 (Slika 26A1). Na osnovu vrednosti varijanse izračunata je vrednost standardne devijacije unutar grupe kao $\sqrt{0,0077} = 0,0877$, a zatim je procenjena i maksimalna veličina efekta na osnovu kvantitativne veze između ova dva parametra $M = 7 \cdot s = 1,848$ (Slob, 2017). Tri intenziteta efekta izračunata su na osnovu vrednosti $M = 1,848$ na sledeći način:

Jak efekat = $M^{1/2} = 1,848^{1/2} = 1,360$ puta povećanje efekta ili 36%,

Umeren efekat = $M^{1/4} = 1,848^{1/4} = 1,166$ puta povećanje efekta ili 17%,

Slab efekat = $M^{1/8} = 1,848^{1/8} = 1,080$ puta povećanje efekta ili 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 $CED_{45} = 1822$ $\mu\text{mol/kg}$, $CED_{20} = 162$ $\mu\text{mol/kg}$ i $CED_{10} = 12$ $\mu\text{mol/kg}$ (Slika 27). Isti intenzitet efekta reaktivacije BuChE (bilo da se posmatra jak, umeren ili slab) se postiže nižom dozom

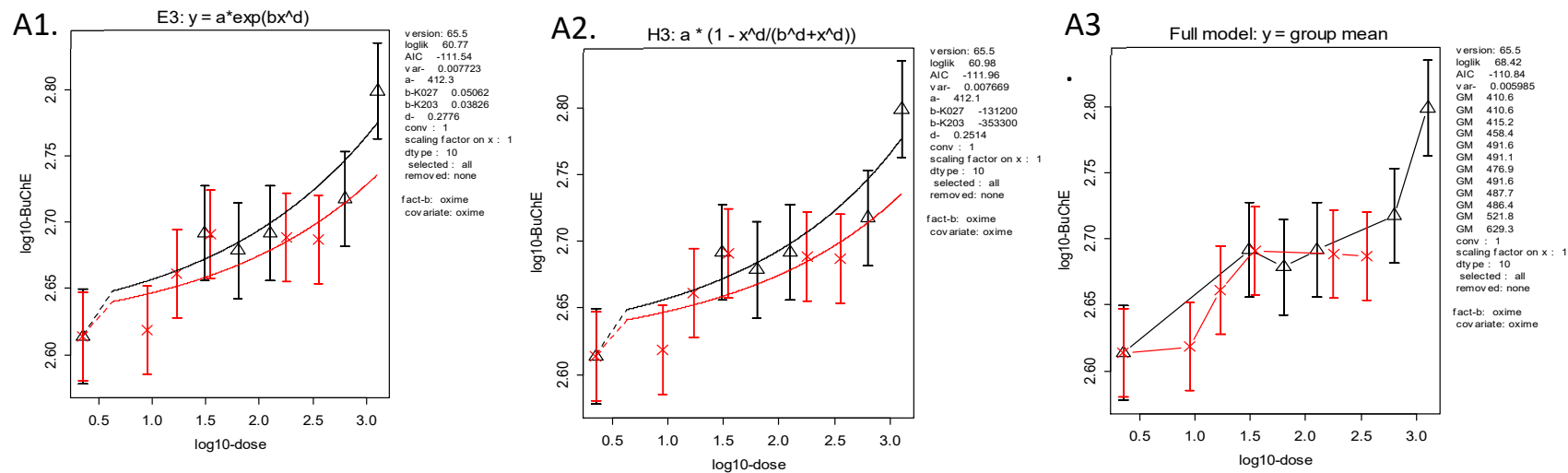
oksima K027 u poređenju sa dozom oksima K203. Međutim, intervali pouzdanosti izračunatih doza oksima K027 i K203 su prilično široki, naročito za oksim K203, i dodatno, preklapaju se za sva tri intenziteta efekta ukazujući da se značajna razlika u njihovoj potentnosti da reaktiviraju BuChE u plazmi ne može utvrditi (Slika 27A3-C3).

Preciznost u proceni CED, izražena kao odnos CEDU/CEDL, se povećavala sa porastom veličine efekta (Tabela 12) rezultirajući faktorima 4,1 i 14,4 za oksim K027 i K203, redom. Uočeno je takođe da *Hill-ov* model u ovom slučaju daje preciznije CED, sa faktorima 3,3 za oksim K027 i 12,5 za oksim K203.

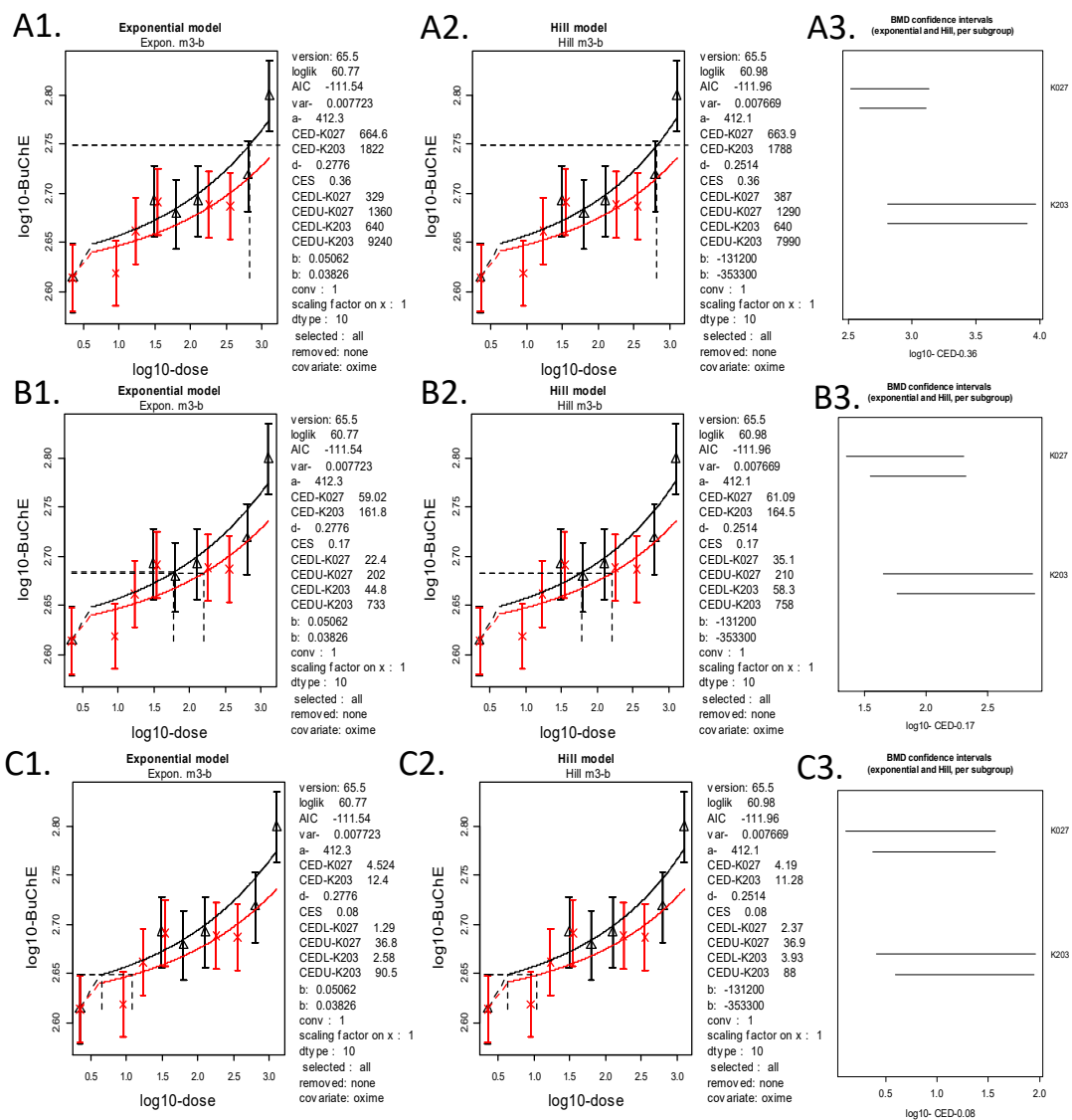
Tabela 12. Doze kritičnog efekta ($\mu\text{mol/kg}$) oksima K027 i K203 sa 90% granicama pouzdanosti i mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) za tri intenziteta efekta reaktivacije BuChE plazme

		Eksponecijalni model m3-b		<i>Hill-ov</i> model m3-b	
		K027	K203	K027	K203
CES=36%	CED	665	1822	664	1788
	CEDL	329	640	387	640
	CEDU	1360	9240	1290	7990
	CEDU/CEDL	4,1	14,4	3,3	12,5
CES=17%	CED	59	162	61	165
	CEDL	22	45	35	58
	CEDU	202	733	210	758
	CEDU/CEDL	9,0	16,4	6,0	13,0
CES=8%	CED	5	12	4	11
	CEDL	1	3	2	4
	CEDU	37	91	37	88
	CEDU/CEDL	28,5	35,1	15,6	22,4

CED - engl. *critical effect dose*; CEDL - engl. *lower, donja* i CEDU - engl. *upper, gornja* granica pouzdanosti CED; CES - engl. *critical effect size*.



Slika 26. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) i aktivnosti BuChE u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni model 3 (1), *Hill*-ov model 3 (2) i *full* model (3).



Slika 27. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) i aktivnosti BuChE u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni (A1, B1, C1) i *Hill*-ov (A2, B2, C2) model 3. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju doze kritičnog efekta oksima (engl. *critical effect dose*, CED, $\mu\text{mol}/\text{kg}$) za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 36% (A), 17% (B) i 8% (C). Na graficima označenim brojem 3 prikazani su 90% intervali pouzdanosti doze kritičnog efekta oksima K027 i K203 (za eksponencijalni i *Hill*-ov model) za tri intenziteta efekta (A3, B3 i C3).

Aktivnost BuChE u plazmi kao funkcija šest rastućih doza oksima K027 i oksima K203 primenjenih sa atropinom (10 mg/kg, *i.m*) opisana je modelom 3 iz obe familije modela, eksponencijalne i *Hill*-ove, koji ispunjava kriterijum za dozno-zavisni trend sa AIC vrednostima ($AIC_{exp} = -137,46$, $AIC_{Hill} = -137,24$) nižim od vrednosti tzv. *full* modela ($AIC_{full} = -128,46$) (Slika 28A1-3). Ovaj model pokazuje da dve krive doza-efekat koje odgovaraju oksimima K203 i K027 imaju različitu vrednost parametra *b* (eksponencijalni model: $b\text{-K203} = 0,02096$ i $b\text{-K027} = 0,02576$), ali ta razlika nije bila značajna, ukazujući da se oksimi uz primenu atropina ne razlikuju u potentnosti da reaktiviraju DDVP-om inhibiranu BuChE plazme. Ovaj troparametarski model nije omogućio procenjivanje parametra *c*, maksimalnog efekta reaktivacije BuChE plazme oksimima K203 i K027.

Iz praktičnog razloga lakšeg praćenja dobijenih rezultata analize, kao i nepostojanja značajne razlike u rezultatima analize eksponencijalnim i *Hill*-ovim modelom, u daljem tekstu su navedeni rezultati analize eksponencijalnim modelom, dok su na slikama prikazani rezultati analiza obe familije modela.

Vrednost varijanse troparametarskog eksponencijalnog modela zavisnosti aktivnosti BuChE plazme od doze oksima K203 i K027 uz primenu atropina iznosila je 0,005014 (Slika 28A1). Na osnovu vrednosti varijanse izračunata je vrednost standardne devijacije unutar grupe kao $\sqrt{0,005} = 0,0708$, a zatim je procenjena i maksimalna veličina efekta na osnovu kvantitativne veze između ova dva parametra $M = 7 * s = 1,642$ (Slob, 2017). Tri intenziteta efekta izračunata su na osnovu vrednosti $M = 1,642$ na sledeći način:

Jak efekat = $M^{1/2} = 1,642^{1/2} = 1,281$ puta povećanje efekta ili 28%,

Umeren efekat = $M^{1/4} = 1,642^{1/4} = 1,132$ puta povećanje efekta ili 13%,

Slab efekat = $M^{1/8} = 1,642^{1/8} = 1,064$ puta povećanje efekta ili 6%.

Doze pri kojima oksimi K027 i K203 ostvaruju prethodno definisane intenzitete efekta reaktivacije BuChE plazme su: za oksim K027 $CE_{D36} = 431$ $\mu\text{mol/kg}$, $CE_{D17} = 63$ $\mu\text{mol/kg}$ i $CE_{D8} = 9$ $\mu\text{mol/kg}$, a za oksim K203 $CE_{D45} = 716$ $\mu\text{mol/kg}$, $CE_{D20} = 110$ $\mu\text{mol/kg}$ i $CE_{D10} = 15$ $\mu\text{mol/kg}$ (Slika 29). Isti intenzitet efekta reaktivacije BuChE (bilo da se posmatra jak, umeren ili slab) se postiže nižom dozom oksima K027 u poređenju sa dozom oksima K203 datih u kombinaciji sa atropinom. Zbog izostanka značajne razlike u parametru *b* doza-efekat krivih oksima K027 i

K203 uz primenu atropina, nisu generisani grafici intervala pouzdanosti u softveru. Dodatno, intervali pouzdanosti izračunatih doza oksima K027 i K203 su široki i preklapaju se za sva tri intenziteta efekta, ukazujući da razlika u njihovoj potentnosti da reaktiviraju BuChE u plazmi nije statistički značajna (Tabela 17).

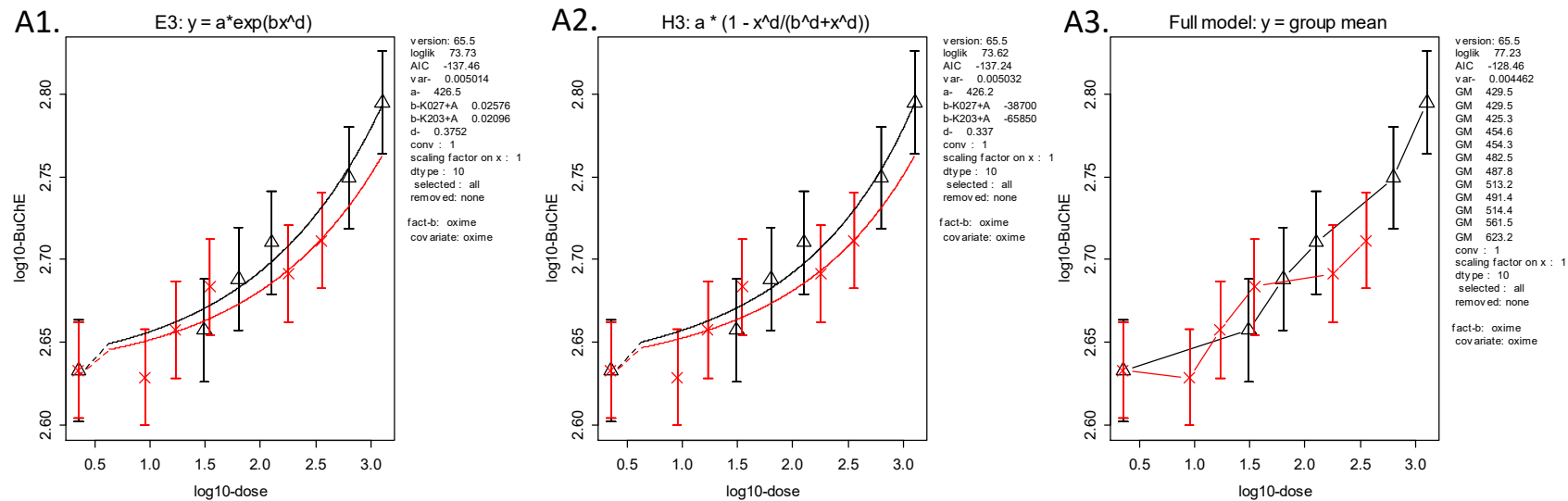
Preciznost u proceni CED, izražena kao odnos CEDU/CEDL, se povećavala sa porastom intenziteta efekta (Tabela 13) rezultirajući faktorima 2,8 i 4,7 za oksim K027 i K203 primenjenih sa atropinom, redom, pokazujući da je informativnost doza-efekat podataka za reaktivaciju BuChE plazme značajno bolja od one koja je dobijena kada su oksimi dati samostalno (Tabela 12).

Tabela 13. Doze kritičnog efekta ($\mu\text{mol/kg}$) oksima K027 i K203 primenjenih sa atropinom (A) sa 90% granicama pouzdanosti i mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) za tri intenziteta efekta reaktivacije BuChE plazme

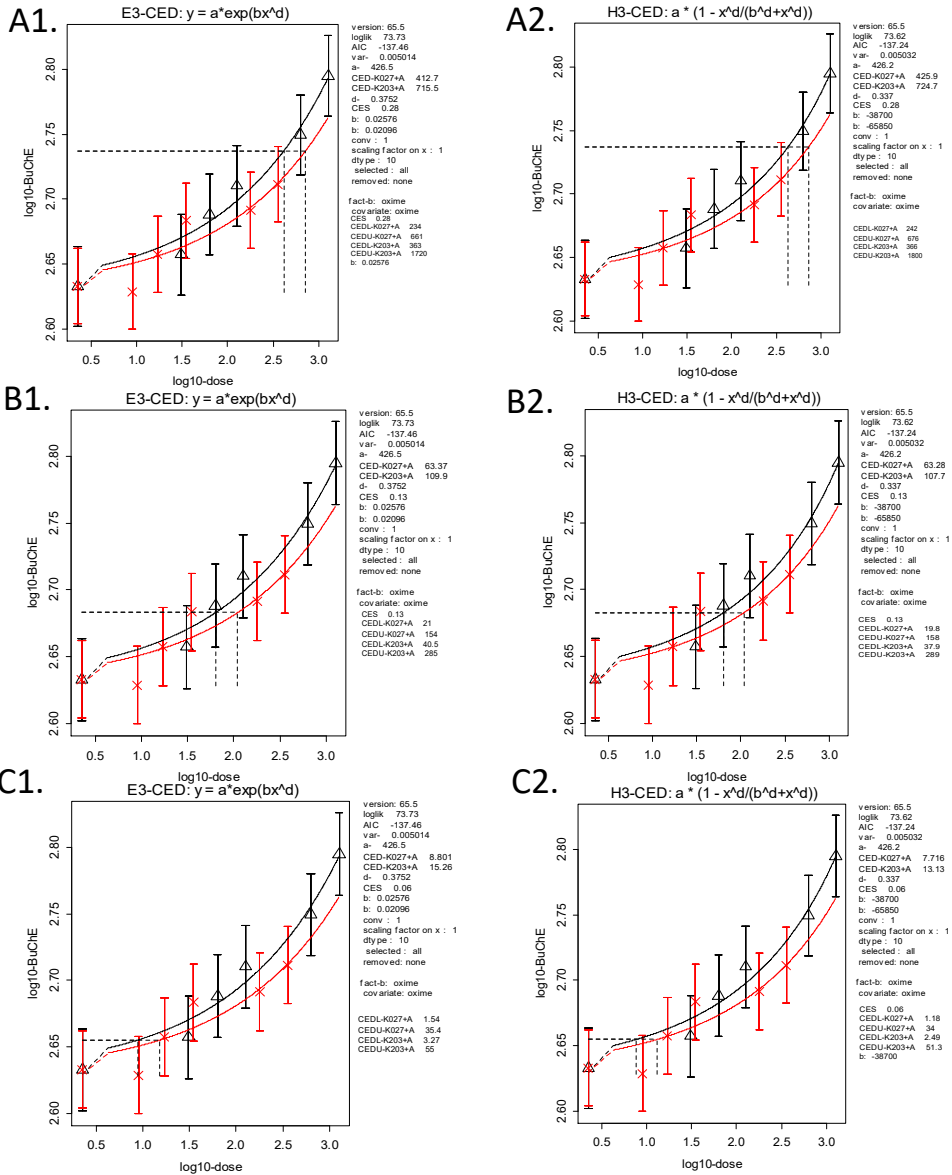
		Eksponecijalni model m3-b		Hill-ov model m3-b	
		K027+A	K203+A	K027+A	K203+A
CES=28%	CED	413	716	426	725
	CEDL	234	363	242	366
	CEDU	661	1720	676	1800
	CEDU/CEDL	2,8	4,7	2,8	4,9
CES=13%	CED	63	110	63	108
	CEDL	21	41	20	38
	CEDU	154	285	158	289
	CEDU/CEDL	7,3	7,0	8,0	7,6
CES=6%	CED	9	15	8	13
	CEDL	2	3	1	2
	CEDU	35	55	34	51
	CEDU/CEDL	23,0	16,8	28,8	20,6

CED - engl. *critical effect dose*; CEDL - engl. *lower, donja* i CEDU - engl. *upper, gornja* granica pouzdanosti CED; CES - engl. *critical effect size*.

Promena reaktivacije BuChE plazme u funkciji doze K-oksima, izražena kroz odnos $\text{CED}_{\text{jak}}/\text{CED}_{\text{umeren}}$, bila je jednaka faktoru 11,3 (90% granice pouzdanosti 6,7-14,7), odnosno faktoru 6,5 (90% granice pouzdanosti 4,3-11,1) kada su K-oksimi primenjeni sa atropinom.



Slika 28. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) primenjenih sa atropinom (A) i aktivnosti BuChE u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni model 3 (1), *Hill*-ov model 3 (2) i *full* model (3).



Slika 29. Odnos doza oksima K027 (trouglovi, crna kriva) i oksima K203 (krstići, crvena kriva) primenjenih sa atropinom (A) i aktivnosti BuChE u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om. Krive predstavljaju eksponencijalni (A1, B1, C1) i *Hill*-ov (A2, B2, C2) model 3. Vertikalne i horizontalne isprekidane linije predstavljaju doze kritičnog efekta oksima (engl. *critical effect dose*, CED, $\mu\text{mol/kg}$) za tri intenziteta efekta (engl. *critical effect size*, CES) 28% (A), 13% (B) i 6% (C).

4.5. Antioksidativni potencijal oksima kod pacova trovanih dihlorvosom

4.5.1. Efekat atropina i/ili oksima na redoks status u plazmi

Nakon supkutanog davanja doze od 75% LD₅₀ DDVP-a, nivoi oba praćena prooksidativna biomarkera u plazmi pacova, O₂^{·-} i TOS, bili su znaćajno povišeni u poređenju sa kontrolom i to 2,6 i 1,9 puta, redom (velićina efekta 76% za oba biomarkera) (Slika 30). Primena DDVP-a znaćajno je smanjila nivo aktivnosti SOD (velićina efekta 53%) (Slika 31a), kao i nivo TAS-a (velićina efekta 76%) u plazmi pacova u poređenju sa vrednostima u kontrolnoj grupi (Slika 31b). Sa druge strane, znaćajno povišeni nivoi ukupnih -SH grupa (velićina efekta 76%) su zabelećeni u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 31c). Primena DDVP-a dovela je do znaćajnog sniženja aktivnosti PON1 na 50% kontrolne aktivnosti (velićina efekta 76%) (Slika 31d).

Indeks oksidativnog stresa, matematićki dobijen kao odnos biomarkera TOS i TAS, imao je 11 puta višu vrednost za grupu tretiranu DDVP-om u poređenju sa kontrolnom grupom, pokazujući jasni disbalans redoks statusa u korist prooksidanasa u plazmi (Slika 32b). Tretman DDVP-om nije doveo do znaćajnih promena PAB u plazmi pacova (Slika 32a).

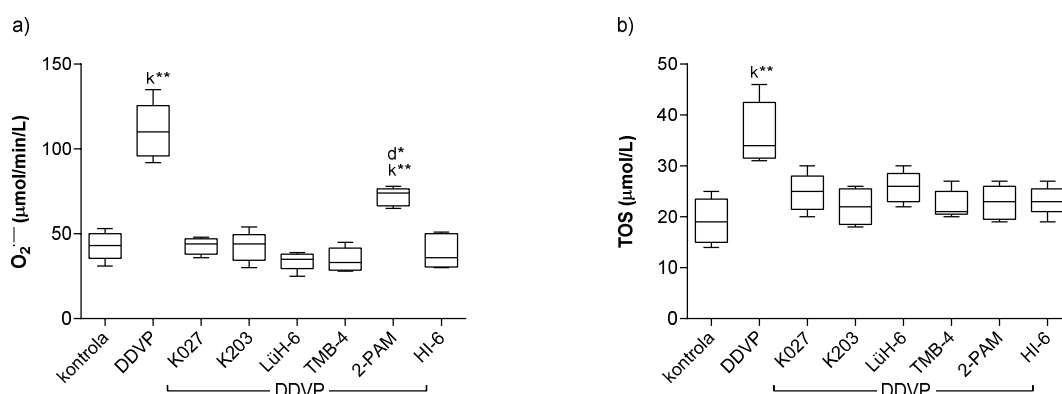
Konaćno, primena DDVP-a povećala je nivo e MDA za oko 2 puta u odnosu na kontrolne vrednosti ovog biomarkera (velićina efekta 53%) (Slika 33a). Takode, znaćajan porast u vrednostima nivoa AOPP-a (velićina efekta 80%) dobijen je nakon tretmana DDVP-om u odnosu na kontrolu (Slika 33b).

Nivoi prooksidativnih biomarkera, O₂^{·-} i TOS, povišeni u plazmi pacova trovanih DDVP-om, bili su sniženi na nivo kontrolnih vrednosti nakon primene oksima, sa izuzetkom pralidoksima, koji nije uspeo da smanji nivo O₂^{·-} na kontrolnu vrednost (Slika 31). Nakon tretmana oksimima, snižene aktivnosti enzimskih antioksidanasa SOD i PON1 u plazmi pacova usled dejstva DDVP-a, bile su znaćajno povišene (Slika 31a i d). Ćak su nakon primene obidoksima, trimedoksima i pralidoksima izmerene aktivnosti PON1 bile znaćajno više i od aktivnosti ovog

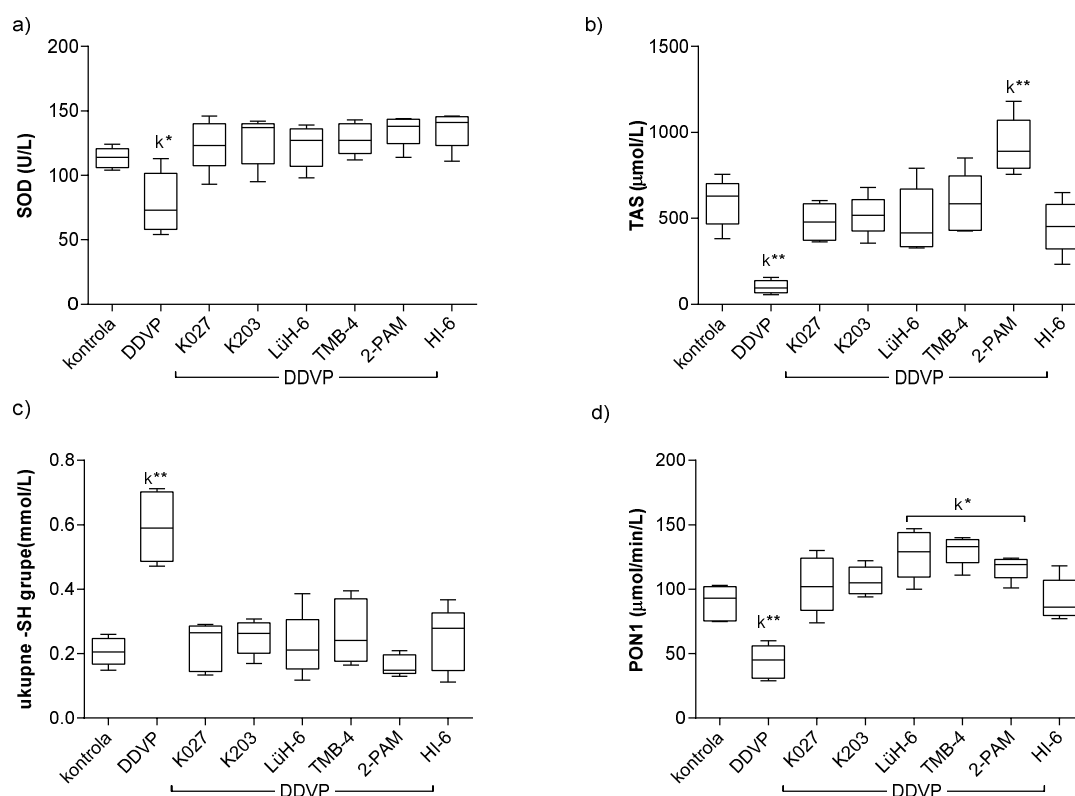
enzima u kontrolnoj grupi (Slika 31d). Redukovan TAS u plazmi usled dejstva DDVP-a, bio je vraćen na kontrolni nivo nakon primene svakog od ispitivanih oksima (Slika 31b). Povišeni novi ukupnih -SH grupa usled dejstva DDVP-a, značajno su sniženi nakon primene oksimskog tretmana na vrednosti kontrole (Slika 31c).

Kao rezultat pada TOS-a i porasta TAS-a, izračunate vrednosti indeksa oksidativnog stresa bile su značajno niže i jednake kontroli nakon svih oksimskih tretmana u odnosu na DDVP-tretman (Slika 32b).

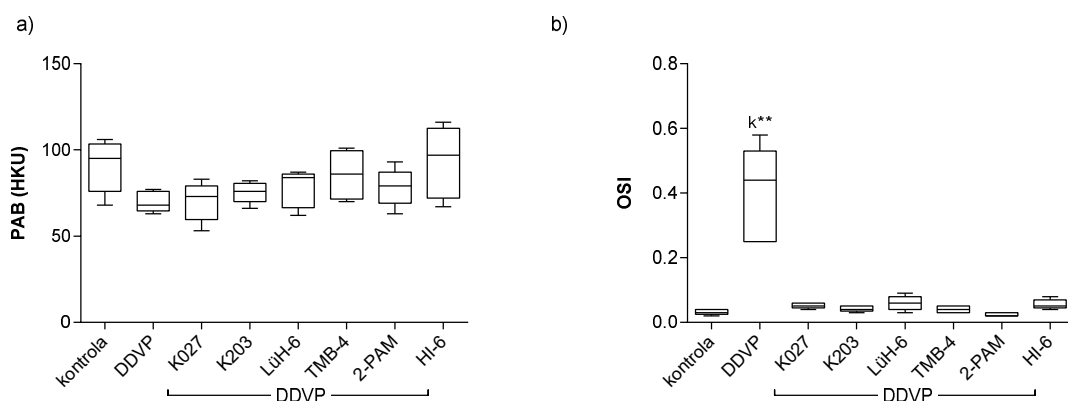
Povišeni nivoi MDA u plazmi pacova trovanih DDVP-om, bili su značajno sniženi na nivo netretirane kontrole jedino nakon primene obidoksima (Slika 33a). Izmereni su značajno niži nivoi AOPP-a u plazmi pacova nakon primene oksima K027 i azoksima u odnosu na grupu tretiranu samo DDVP-om, dok su obidoksim i trimedoksim dali i značajno više vrednosti AOPP (Slika 33b).



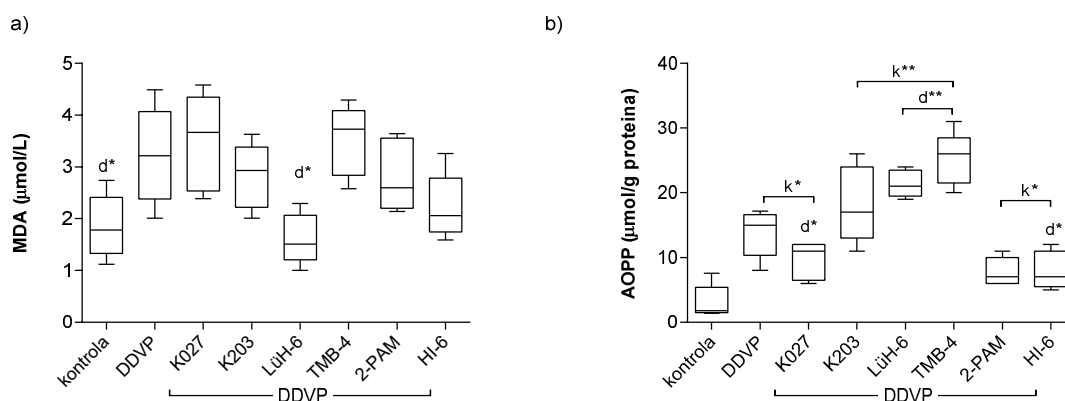
Slika 30. Prooksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD_{50} , *s.c*) i oksima (5% LD_{50} , *i.m*): a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot -}$) i b) totalni oksidativni status (TOS). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe ($n=5$). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 31. Antioksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, s.c) i oksima (5% LD₅₀, i.m): a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD), b) totalni antioksidativni status (TAS), c) ukupne -SH grupe i d) aktivnost paraoksonaze (PON1). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney U*).



Slika 32. Prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) (a) i indeks oksidativnog stresa (OSI) (b) u plazmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, s.c) i oksima (5% LD₅₀, i.m). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney U*).



Slika 33. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u plazmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c*) i oksima (5% LD₅₀, *i.m*): a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney U*).

Atropin dat samostalno je značajno uticao na pojedinačne biomarkere redoks statusa u plazmi pacova vraćajući ih na nivoe kontrolne grupe: smanjio povišene nivoe prooksidanasa i povećao snižene nivoe antioksidanasa usled dejstva DDVP-a (Slika 34-37). Međutim, njegov efekat se nije odrazio na nivoe MDA i AOPP, s obzirom da nije dobijena značajna razlika u nivoima ova dva biomarkera u odnosu na DDVP-u izloženu grupu životinja (p=0,347 i p=0,248, redom) (Slika 37).

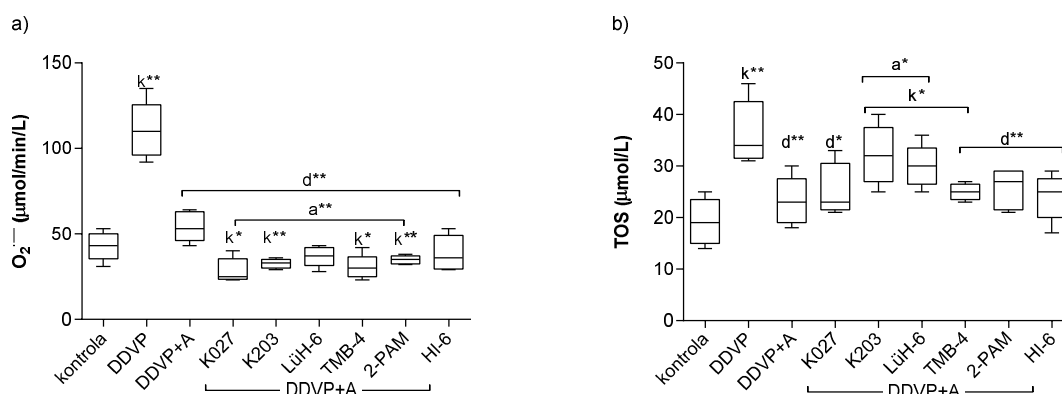
Svi oksimi dati u kombinaciji sa atropinom značajno su smanjili nivoe O₂^{·-} u plazmi pacova trovanih DDVP-om, a nivoui i niži od kontrolnih dobijeni su za oksime K027, K203, trimedoksim i pralidoksim (Slika 34a). Povišen TOS, usled dejstva DDVP-a, bio je snižen na nivo kontrole pri davanju oksima K027, pralidoksima i azoksima uz atropin, dok je bio značajno niži, ali ne i na nivou kontrole nakon terapije trimedoksimom i atropinom (Slika 34b). Kombinacije oksima K203 i obidoksima sa atropinom nisu značajno uticale na TOS u plazmi pacova (p=0,402 i p=0,059, redom) (Slika 34b).

Aktivnost SOD u plazmi pacova nakon davanja svih oksima u kombinaciji sa atropinom bila je značajno viša ne samo od aktivnosti u grupi izloženoj DDVP-u već i od kontrolne grupe (Slika 35a). Svi oksimi dati sa atropinom značajno su povećali

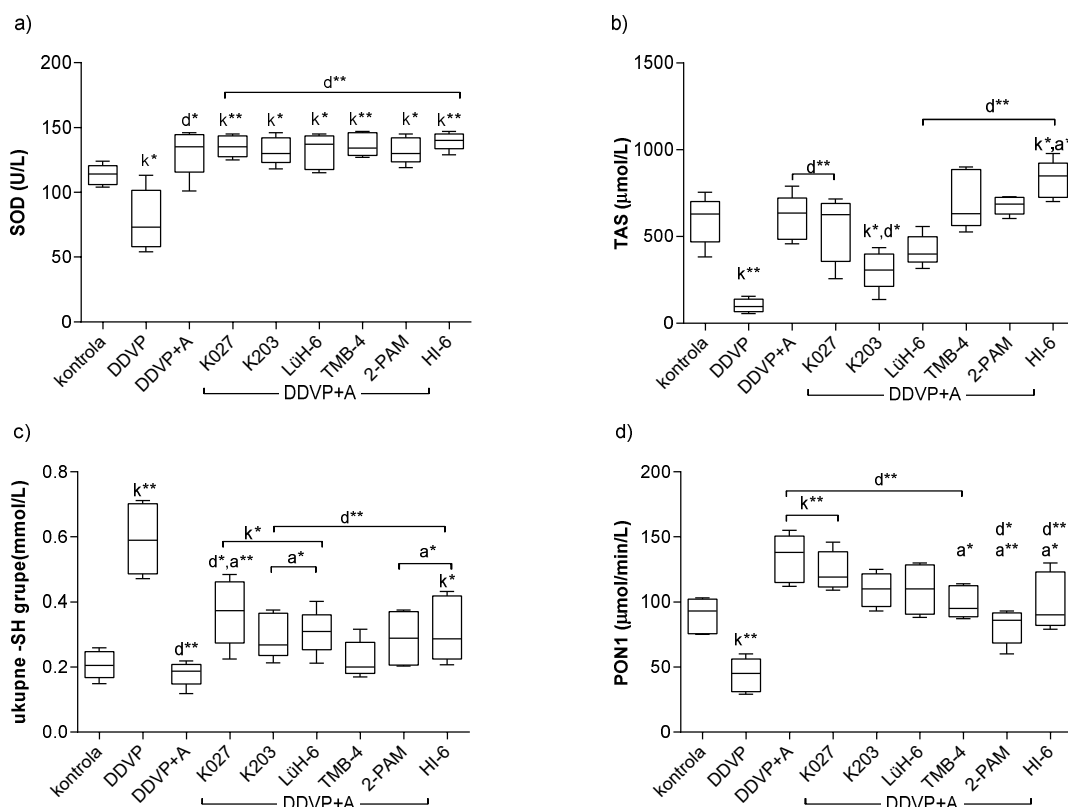
TAS u plazmi pacova tretiranih DDVP-om, pri čemu je najizraženiji efekat dobijen za azoksim čiji efekat je bio značajno viši i u odnosu na kontrolu ($p=0,028$), a najslabiji za oksim K203 koji nije dostigao nivo kontrolne grupe ($p=0,016$) (Slika 35b). Povišeni nivoi ukupnih -SH grupa u plazmi pacova trovanih DDVP-om bili su značano niži nakon tretmana oksimima u kombinaciji sa atropinom, pri čemu je nivo kontrole dobijen jedino za kombinacije trimedoksima i pralidoksima sa atropinom (Slika 35c). Oksimska terapija u kombinaciji sa atropinom povećala je aktivnost PON1 na nivo kontrole u odnosu na njenu sniženu aktivnost kod DDVP-u izloženih životinja, a kombinacija oksima K027 i atropina dala je aktivnosti ovog enzima i višu od kontrolne (Slika 35d).

I u kombinaciji sa atropinom svi oksimi su dali značajno niži indeks oksidativnog stresa u plazmi pacova tretiranih DDVP-om, s tim da on nije bio na nivou kontrolne grupe jedino za oksime K203 i obidoksim (Slika 36).

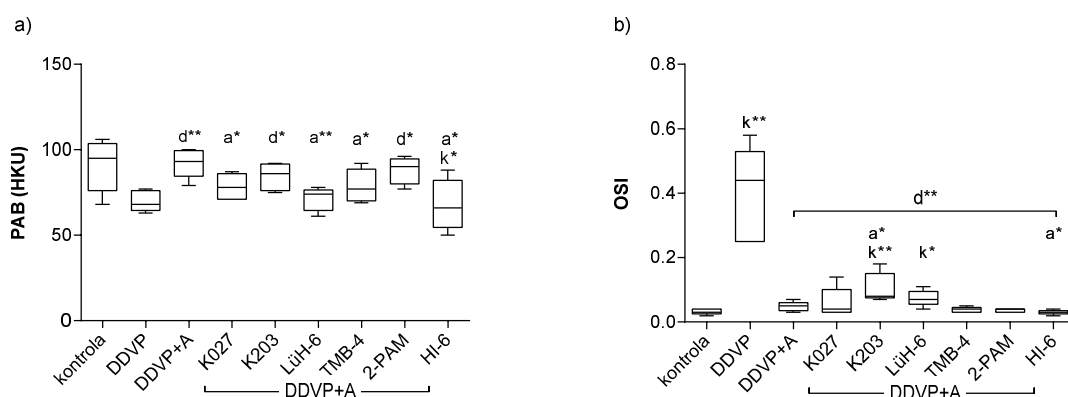
Povišene nivoe MDA u plazmi pacova tretiranih DDVP-om, smanjili su značajno u kombinaciji sa atropinom jedino obidoksim i trimedoksim, dok su povišeni nivoi AOPP-a ostali visoki i nakon davanja oksima sa atropinom, a bili i značajno viši za kombinacije obidoksima, pralidoksima i trimedoksima sa atropinom (Slika 37).



Slika 34. Prooksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c*), oksima (5% LD₅₀, *i.m*) i atropina (A, 10 mg/kg, *i.m*): a) superoksidni anjon (O₂⁻) i b) totalni oksidativni status (TOS). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).

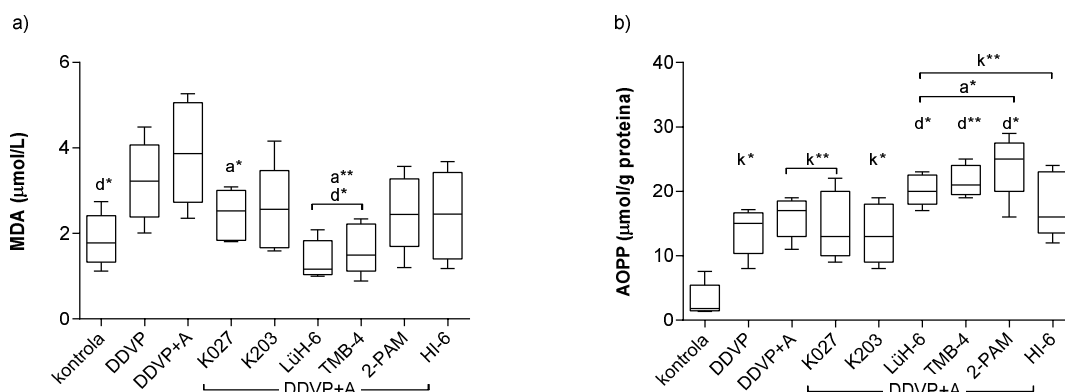


Slika 35. Antioksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c*), oksima (5% LD₅₀, *i.m*) i atropina (A, 10 mg/kg, *i.m*): a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD), b) totalni antioksidativni status (TAS), c) ukupne -SH grupe (mmol/L) i d) aktivnost paraoksonaze (PON1). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney U*).



Slika 36. Prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) (a) i indeks oksidativnog stresa (OSI) (b) u plazmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c*), oksima (5% LD₅₀, *i.m*) i atropina (A, 10 mg/kg, *i.m*). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5).

Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, *p<0,05, **p<0,01 (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 37. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u plazmi mužjaka Wistar pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c*), oksima (5% LD₅₀, *i.m*) i atropina (A, 10 mg/kg, *i.m*): a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP). Box predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar box-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, *p<0,05, **p<0,01 (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).

Naveći uticaj atropin je imao na antioksidativni efekat pralidoksima i to u smislu da je kombinacija imala bolji efekat od samostalno datog pralidoksima jedino na nivou O₂^{·-}, dok je imala lošiji efekat na nivou TAS, ukupnih SH-grupa, aktivnosti PON1, OSI i AOPP (Tabela 14). Najpovoljniji efekat atropin je ostvario u kombinaciji sa trimedoksimom i to smanjenjem nivoa MDA na nivo kontrolne grupe u plazmi pacova tretiranih DDVP-om. Uključivanje atropina u antidotsku terapiju nije imalo značajnog efekta ni na jedan od biomarkera redoks statusa plazme koje je ostvario obidoksim dat samostalno.

Tabela 14. Uticaj atropina (10 mg/kg, *i.m.*) na antioksidativni efekat oksima (5% LD₅₀, *i.m.*) u plazmi pacova trovanih DDVP-om (75% LD₅₀, *s.c.*).

Terapija	Biomarker	O₂⁻	TOS	SOD	TAS	-SH gr.	PON1	PAB	OSI	MDA	AOPP
K027 vs. K027+A	p vrednost	0,021	1,000	0,251	0,347	0,047	0,117	0,249	0,522	0,117	0,141
	p značajnost	*↓	ns	ns	ns	*↑	ns	ns	ns	ns	ns
	veličina efekta (%)	73	/	/	/	63	/	/	/	/	/
K203 vs. K203+A	p vrednost	0,076	0,021	0,834	0,028	0,465	0,754	0,117	0,008	0,465	0,209
	p značajnost	ns	*↑	ns	*↓	ns	ns	ns	***↑	ns	ns
	veličina efekta (%)	/	73	/	69	/	/	/	83	/	/
LüH-6 vs. LüH-6+A	p vrednost	0,287	0,094	0,347	0,754	0,117	0,175	0,251	0,341	0,530	0,399
	p značajnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	veličina efekta (%)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
TMB-4 vs. TMB-4+A	p vrednost	0,347	0,114	0,209	0,251	0,602	0,021	0,347	0,740	0,009	0,114
	p značajnost	ns	ns	ns	ns	ns	*↓	ns	ns	***↓	ns
	veličina efekta (%)	/	/	/	/	/	73	/	/	83	/
2-PAM vs. 2-PAM+A	p vrednost	0,009	0,207	0,754	0,009	0,021	0,009	0,142	0,020	0,602	0,009
	p značajnost	***↓	ns	ns	***↓	*↑	***↓	ns	*↑	ns	***↑
	veličina efekta (%)	83	/	/	83	73	83	/	73	/	83
HI-6 vs. HI-6+A	p vrednost	0,753	0,597	0,917	0,009	0,295	0,602	0,047	0,011	0,754	0,012
	p značajnost	ns	ns	ns	***↑	ns	ns	*↓	*↓	ns	*↑
	veličina efekta (%)	/	/	/	83	/	/	63	81	/	80

A - atropin; ns - nije značajno različito (p>0,05); značajno različito *(0,05>p>0,01), **(0,01>p>0,001); ↑povećanje, ↓smanjenje.

4.5.2. Efekat atropina i/ili oksima na redoks status u dijafragmi

Nivoi prooksidativnih biomarkera $O_2^{\cdot-}$ i TOS nakon supkutanog davanja doze od 75% LD₅₀ DDVP-a, bili su 2,4 i 3,8 puta viši u odnosu na kontrolne nivoe, redom (veličina efekta 83% za oba biomarkera) (Slika 38). Aktivnost SOD u dijafragmi usled dejstva DDVP-a bila je u odnosu na kontrolu 1,5 puta veća (veličina efekta 76%), a TAS značajno smanjen 13,7 puta (veličina efekta 83%) (Slika 39a i b). Značajno povišeni nivoi ukupnih -SH grupa 2,6 puta (veličina efekta 83%) dobijeni su u dijafragmi pacova trovanih DDVP-om u odnosu na netretirane životinje (Slika 39c).

Kao rezultat značajnog porasta TOS i pada TAS u dijafragmi pacova dobijen je oko 17 puta veći indeks oksidativnog stresa u DDVP-tretiranoj grupi u odnosu na kontrolu (veličina efekta 83%) (Slika 40).

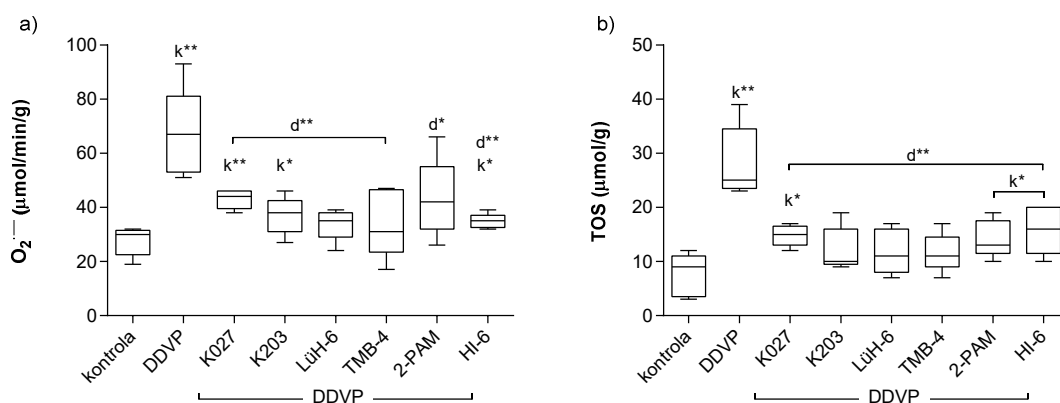
Konačno, nivo MDA u dijafragmi pacova trovanih DDVP-om je bio 5,7 puta viši u odnosu na kontrolne nivoe, dok DDVP nije značajno uticao jedino na nivo AOPP-a u tkivu dijafragme (Slika 41).

Povišene vrednosti prooksidativnih parametara $O_2^{\cdot-}$ i TOS usled dejstva DDVP-a, bile su značajno snižene nakon primene oksima, s tim da su vrednosti $O_2^{\cdot-}$ bile jednake kontrolnim nivoima kada su davani obidoksim, trimedoksim i pralidoksim (Slika 38a). Takođe, vrednosti TOS nisu se značajno razlikovale od kontrolnih posle terapije obidoksimom i trimedoksimom, ali i oksimom K203 (Slika 38b). Oksimi, sa izuzetkom azoksima, značajno je smanjila aktivnost SOD u dijafragmi pacova povišenu od strane DDVP-a, tako da je aktivnost SOD dosegla nivo kontrolne vrednosti, pri čemu su nešto intenzivniji efekat dali obidoksim i trimedoksim u odnosu na K-oksime i pralidoksim (Slika 39a). Nizak TAS u dijafragmi DDVP-om tretirane grupe pacova značajno su povećali K-oksimi, pralidoksim i azoksim, ali dobijeni efekti nisu bili na nivou kontrolnih vrednosti (Slika 39b). Svaki od ispitivanih oksima značajno je smanjio nivo ukupnih -SH grupa, povišenih usled efekta DDVP-a u dijafragmi pacova, a nakon terapije oksimom K203 i

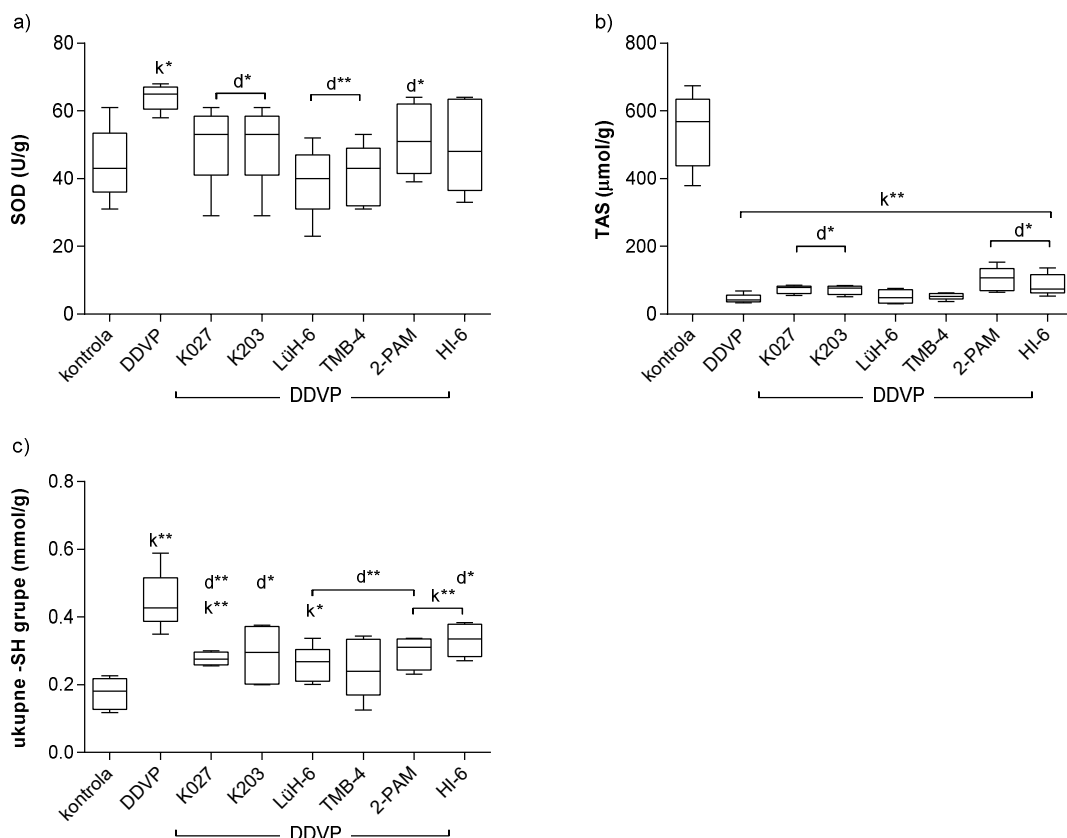
trimedoksimom, nivo ukupnih –SH grupa bio je na nivou kontrolne vrednosti (Slika 39c).

Značajno niži OSI dobijeni su nakon davanja oksimske terapije, pri čemu su veći efekat ostvarili trimedoksim, pralidoksim i azoksim (veličina efekta 83% za sva tri oksima) u odnosu na K-oksime i obidoksim (veličina efekta 76% i 69%, redom) (Slika 40). Međutim, nijedan od ispitivanih oksima nije smanjio OSI na nivo netretirane kontrole.

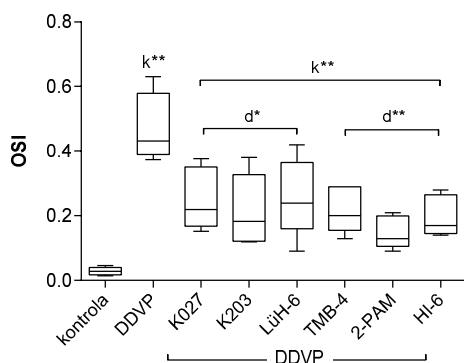
Oksimi su značajno smanjili povišene nivoe MDA u dijafragmi pacova, a nivo kontrole nije postignut jedino za pralidoksim (Slika 41a). Iako sam DDVP u dijafragmi nije doveo do značajne promene nivoa AOPP, obidoksim i trimedoksim su dali nivoe koji su bili značajno niži od onih izmerenih kod DDVP-grupe životinja (veličine efekta 76% i 69%, redom) (Slika 41b).



Slika 38. Prooksidativni biomarkeri u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c*) i oksima (5% LD₅₀, *i.m*): a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) i b) totalni oksidativni status (TOS). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, *p<0,05, **p<0,01 (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).

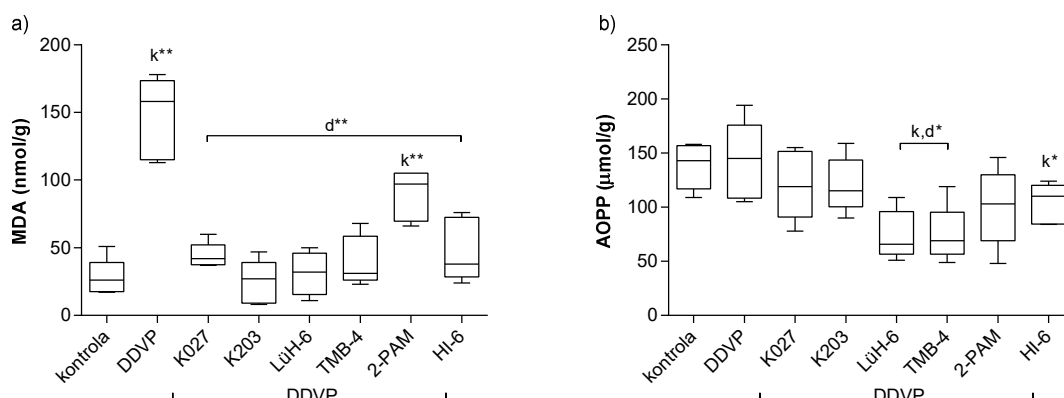


Slika 39. Antioksidativni biomarkeri u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, s.c) i oksima (5% LD₅₀, i.m): a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD), b) totalni antioksidativni status (TAS) i c) ukupne -SH grupe. *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney U*).



Slika 40. Indeks oksidativnog stresa (OSI) u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, s.c) i oksima (5% LD₅₀, i.m). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar

grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, *p<0,05, **p<0,01 (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 41. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c*) i oksima (5% LD₅₀, *i.m*): a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, *p<0,05, **p<0,01 (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).

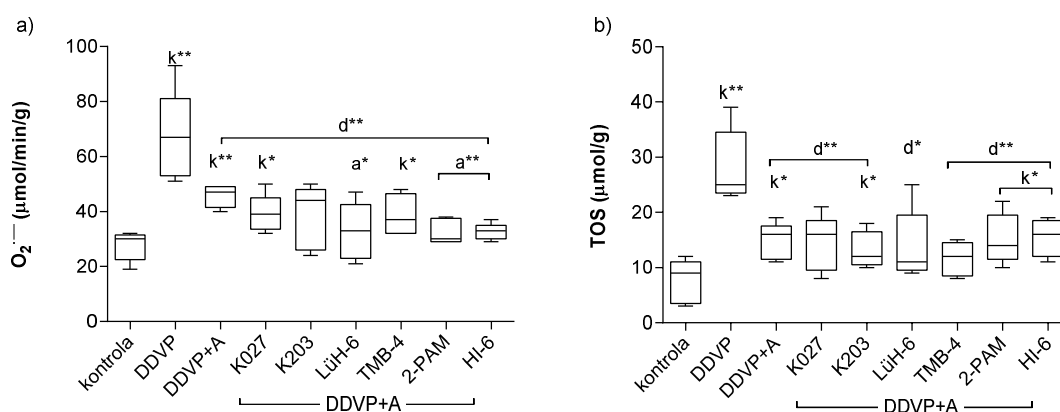
Atropin dat samostalno značajno je smanjio DDVP-om povišene nivoe oba prooksidativna biomarkera (veličina efekta 83%), ali nijedan od biomarkera nije bio smanjen do nivoa kontrolne vrednosti (Slika 42). Od antioksidativnih biomarkera, atropin je značajno smanjio na nivo kontrole DDVP-om povećanu aktivnost SOD (veličina efekta 73%), kao i povišene nivoe ukupnih -SH grupa (veličina efekta 69%), čije smanjenje nije dostiglo nivo kontrolnih vrednosti (veličina efekta 83%) (Slika 43a i c). Međutim, atropin nije imao značajnog uticaja na TAS (p=0,462) (Slika 43b). Nakon terapije atropinom OSI u dijafragmi DDVP-u izloženih životinja, je značajno smanjen, ali i dalje je bio 10 puta viši od vrednosti OSI kod kontrolnih životinja (Slika 44). Atropin nije doveo do značajnih promena nivoa MDA, kao ni AOPP-a u dijafragmi pacova trovanih DDVP-om (p=0,675 i p=0,834, redom) (Slika 45).

Primena atropina zajedno sa oksimima dovela je do značajnog smanjenja nivoa oba praćena prooksidativna biomarkera, povišena kod DDVP-grupe životinja (Slika 42). Nivoi O₂⁻ su bili na nivou kontrolnih nakon terapije oksimom K203, pralidoksimom i azoksimom datih sa atropinom (veličine efekta 83%), dok su nivoi

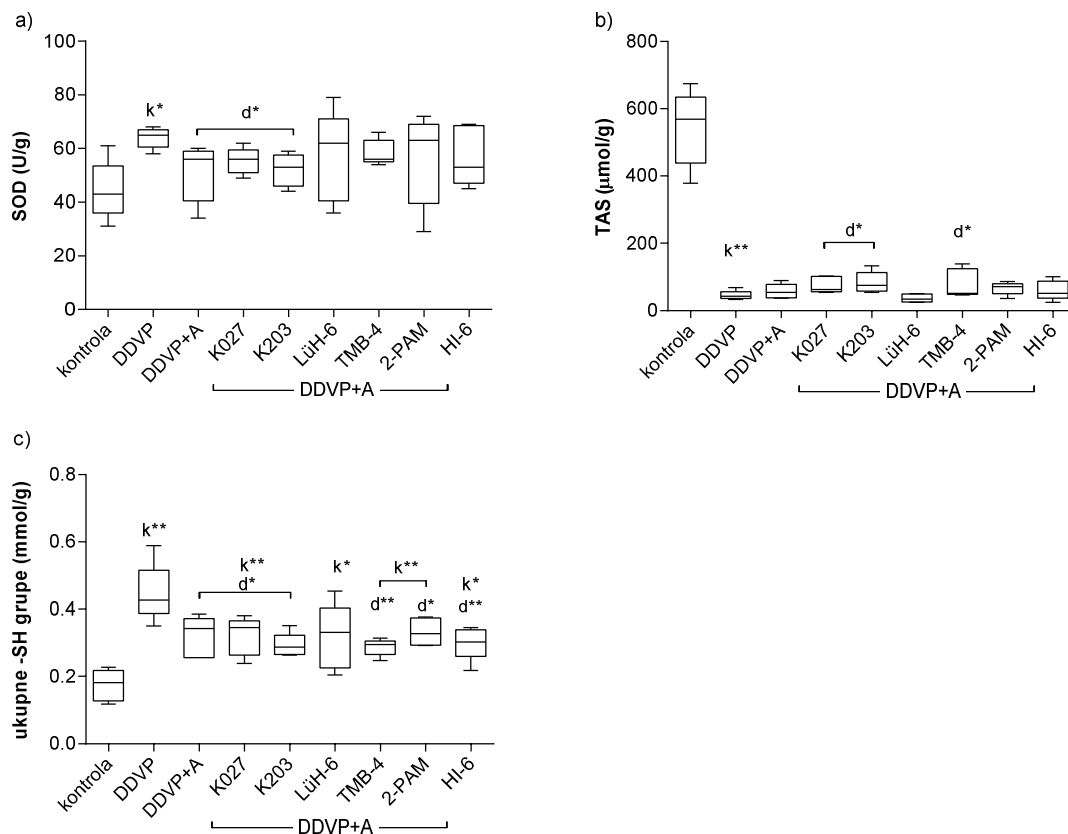
TOS bili na kontrolnom nivou nakon terapije oksimom K027, obidoksimom i trimedoksimom datim uz atropin (veliĉine efekta 83%). Znaĉajno smanjenje aktivnosti SOD u dijafragmi DDVP-om tretiranih pacova, dobijeno je nakon terapije K-oksimuma uz atropin (veliĉina efekta 76%) (Slika 43a). Primena atropina sa K-oksimuma i trimedoksimom dovela je do znaĉajnog povećanja nivoa TAS, ali je on ostao daleko ispod kontrolnih nivoa (veliĉina efekta 83%) (Slika 43b). Terapija atropinom i oksimuma, sa izuzetkom obidoksima, je dovela do znaĉajnog smanjenja ukupnih -SH grupa u dijafragmi, ali su oni bili znaĉajno viši od kontrolnih (Slika 43c).

Uticaj svih ispitivanih oksima promenjenih sa atropinom na TOS i TAS, rezultirao je znaĉajnim smanjenjem OSI u dijafragmi pacova trovanih DDVP-om, ali ovo smanjenje nije doseglo nivo kontrolnih vrednosti (Slika 44).

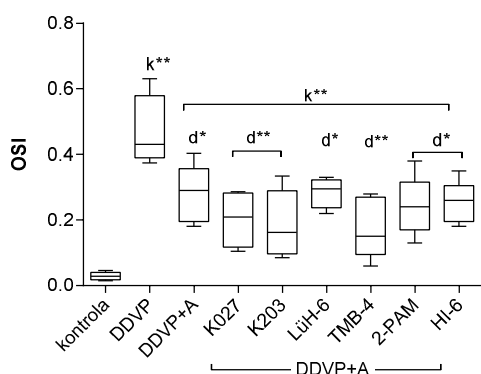
Jedino je kombinacija atropina i obidoksima dovela do znaĉajnog smanjenja povišenog nivoa MDA u dijafragmi usled dejstva DDVP-a (veliĉina efekta 77%), ali ne do kontrolnih nivoa (veliĉina efekta 76%) (Slika 45a). Iako sam DDVP, kao ni sam atropin dat kao terapija, nisu prouzrokovali znaĉajne promene nivoa AOPP u dijafragmi, u odnosu na kontrolu, svi oksimi, osim K-oksimuma, doveli su do znaĉajnog smanjenja AOPP u odnosu na kontrolu (Slika 45b).



Slika 42. Prooksidativni biomarkeri u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, s.c), oksima (5% LD₅₀, i.m) i atropina (A, 10 mg/kg, i.m): a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) i b) totalni oksidativni status (TOS). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Znaĉajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, *p<0,05, **p<0,01 (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).

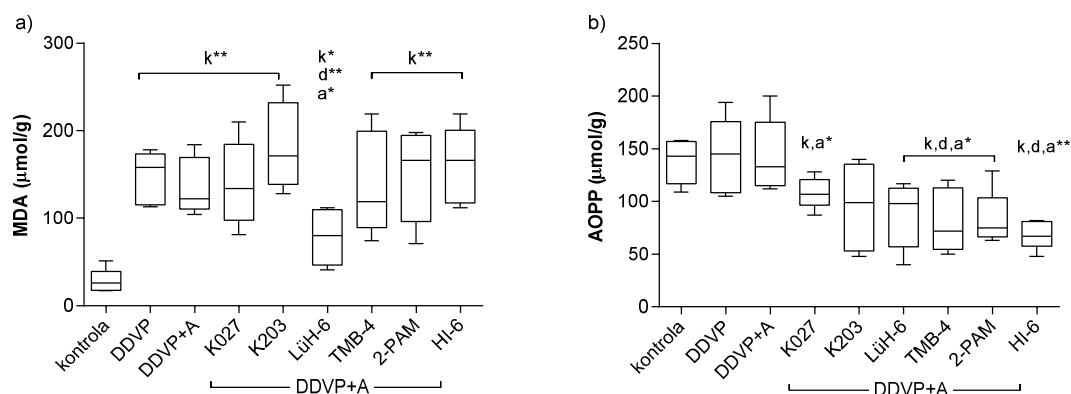


Slika 43. Antioksidativni biomarkeri u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c.*), oksima (5% LD₅₀, *i.m.*) i atropina (A, 10 mg/kg, *i.m.*): a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD), b) totalni antioksidativni status (TAS) i c) ukupne -SH grupe. *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney U*).



Slika 44. Indeks oksidativnog stresa (OSI) u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c.*), oksima (5% LD₅₀, *i.m.*) i atropina (A, 10 mg/kg, *i.m.*). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i

maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, *p<0,05, **p<0,01 (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 45. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c*), oksima (5% LD₅₀, *i.m*) i atropina (A, 10 mg/kg, *i.m*): a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, *p<0,05, **p<0,01 (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).

Uticaj atropina na antioksidativni efekat oksima u dijafragmi pacova trovanih DDVP-om najviše se odrazio na nivoe MDA i dovelo je do značajno viših nivoa MDA za sve oksime, osim pralidoksima (Tabela 15). Kao što je već navedeno, u odnosu na DDVP- grupu značajno manji nivoi MDA u dijafragmi su dobijeni nakon terapije jedino kombinacijom obidoksima i atropina (Slika 45a).

Tabela 15. Uticaj atropina (10 mg/kg, *i.m*) na antioksidativni efekat oksima (5% LD₅₀, *i.m*) u dijafragmi pacova trovanih DDVP-om (75% LD₅₀, *s.c*)

Terapija	Biomarker	O ₂ ⁻	TOS	SOD	TAS	-SH gr.	OSI	MDA	AOPP
K027 vs. K027+A	p vrednost	0,249	0,916	0,525	0,917	0,251	0,347	0,009	0,602
	p značajnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**↑	ns
	veličina efekta (%)	/	/	/	/	/	/	83	/
K203 vs. K203+A	p vrednost	0,675	0,459	0,832	0,754	0,754	0,465	0,009	0,465
	p značajnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**↑	ns
	veličina efekta (%)	/	/	/	/	/	/	83	/
LüH-6 vs. LüH-6+A	p vrednost	0,754	0,753	0,117	0,209	0,347	0,465	0,028	0,465
	p značajnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*↑	ns
	veličina efekta (%)	/	/	/	/	/	/	69	/
TMB-4 vs. TMB-4+A	p vrednost	0,346	0,834	0,009	0,916	0,602	0,293	0,009	0,675
	p značajnost	ns	ns	**↑	ns	ns	ns	**↑	ns
	veličina efekta (%)	/	/	83	/	/	/	83	/
2-PAM vs. 2-PAM+A	p vrednost	0,141	0,671	0,465	0,094	0,347	0,046	0,075	0,347
	p značajnost	ns	ns	ns	ns	ns	*↑	ns	ns
	veličina efekta (%)	/	/	/	/	/	63	/	/
HI-6 vs. HI-6+A	p vrednost	0,243	0,752	0,251	0,209	0,465	0,173	0,009	0,009
	p značajnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**↑	**↓
	veličina efekta (%)	/	/	/	/	/	/	83	83

A – atropin; ns – nije značajno različito (p>0,05); značajno različito *(0,05>p>0,01), **(0,01>p>0,001); ↑povećanje, ↓smanjenje.

4.5.3. Efekat atropina i/ili oksima na redoks status u mozgu

Nakon supkutanog davanja DDVP-a u dozi od 75% LD₅₀, nivoi prooksidativnih biomarkera, O₂^{·-} i TOS, u mozgu pacova bili su 1,8 puta viši u poređenju sa vrednostima u tkivu kontrolne grupe životinja (veličina efekta 64 i 54%, redom) (Slika 46). Primena DDVP-a je dovela do izvesnog porasta, ali ne i statistički značajnog, aktivnosti SOD, kao i ukupnih -SH grupa u mozgu pacova (p=0,094 i 0,076, redom) (Slika 47a i c), a TAS bio je oko 5 puta smanjen (veličina efekta 76%) (Slika 47b).

Kao rezultat značajnog porasta TOS-a i pada TAS-a u mozgu pacova trovanih DDVP-om, indeks oksidativnog stresa bio je oko 5 puta veći u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 48).

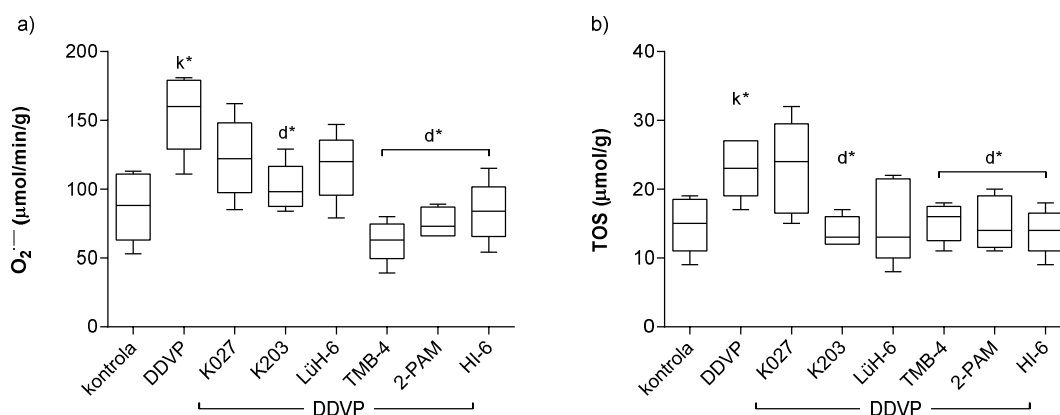
Konačno, primena DDVP-a dovela je do porasta koncentracije MDA u mozgu pacova 2 puta u poređenju sa kontrolom (veličina efekta 64%) (Slika 49a). Nivoi AOPP u mozgu pacova trovanih DDVP-om nisu bili značajno različiti u odnosu na nivoe u tkivu kontrolne grupe iako izvestan porast, ali ne i statsitički značajan, jeste zabeležen (p=0,094) (Slika 49b).

Povišeni nivoi prooksidanasa, O₂^{·-} i TOS, u mozgu pacova trovanih DDVP-om, sniženi su na kontroni nivo nakon primene svih ispitivanih oksima, osim oksima K027 i obidoksima, koji nisu značajno uticali na prooksidanse (Slika 46).

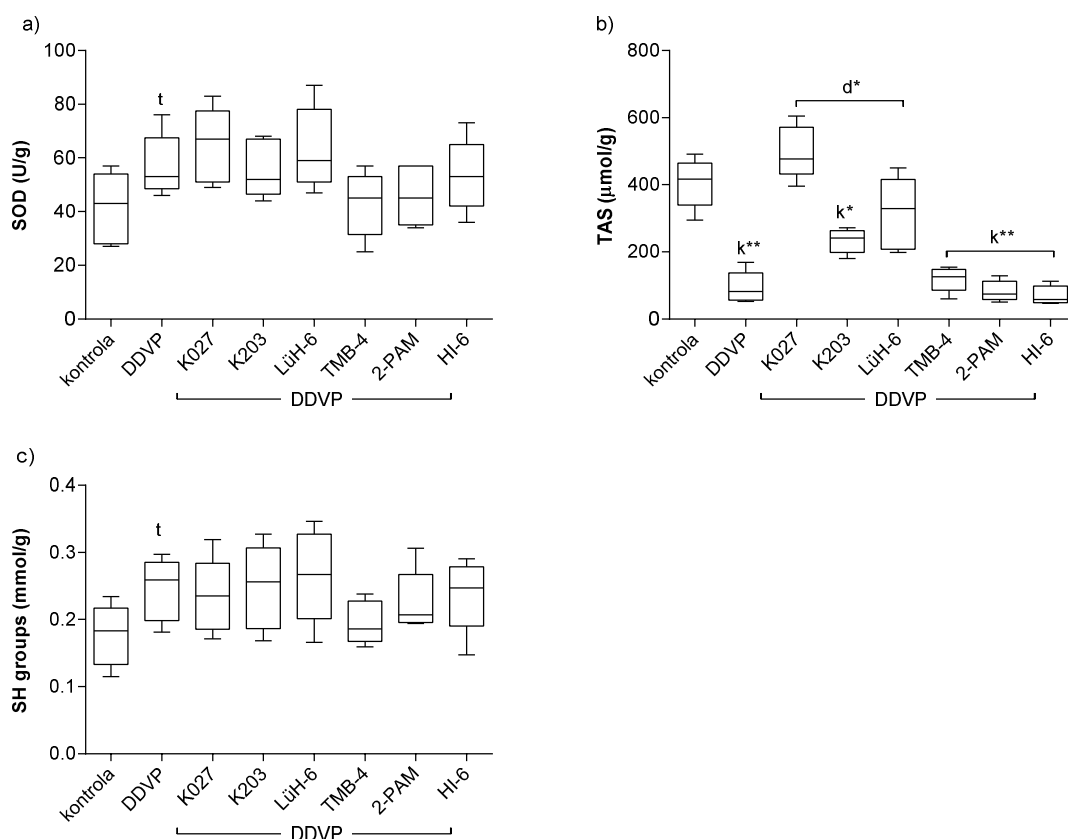
Kao ni primena samog DDVP-a, ni davanje oksimske terapije nije značajno uticalo na aktivnost SOD i nivoe ukupnih -SH grupa u mozgu pacova (Slika 47a i c). Ipak, značajni pad TAS u mozgu pacova trovanih DDVP-om, dosegao je nivo kontrolne grupe nakon primene oksima K027 i obidoksima (Slika 47b). Primena oksima K203 je takođe dovela do povećanja nivoa TAS-a u mozgu u odnosu na grupu izloženu DDVP-u, ali taj nivo nije dosegao kontrolnu vrednost (Slika 47b). Primena pralidoksima, trimedoksima ili azoksima nije značajno uticala na nizak nivo TAS u mozgu pacova trovanih DDVP-om.

Rezultat razlike u efektima oksima na biomarkere TOS i TAS u mozgu pacova trovanih DDVP-om bio je da su vrednosti indeksa oksidativnog stresa bile jednake kontroli nakon primene oksima K027, K203 i obidoksima (Slika 48).

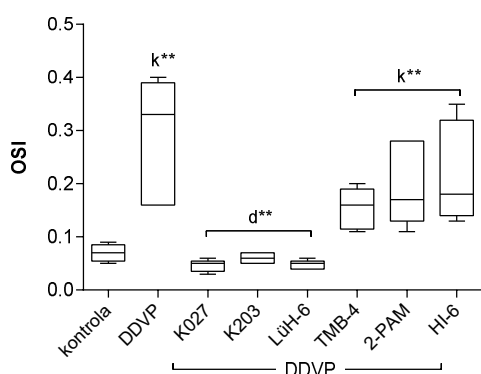
DDVP-om indukovana lipidna peroksidacija u mozgu pacova značajno je umanjena oksimima, sa izuzetkom obidoksima (Slika 49a). Sa druge strane, jedino su u grupi koja je tretirana oksimom K203 dobijeni nivoi AOPP značajno niži od onih kod DDVP-om tretirane grupe životinja (Slika 49b).



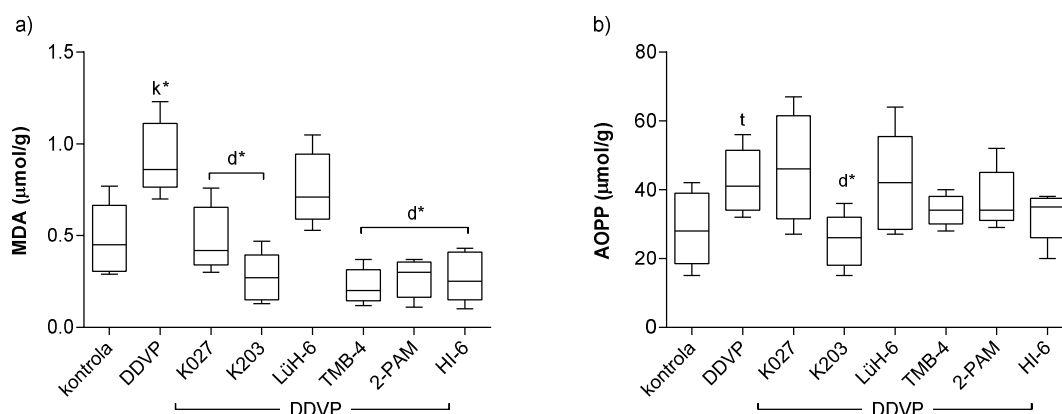
Slika 46. Prooksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c.*) i oksima (5% LD₅₀, *i.m.*): a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot -}$) i b) totalni oksidativni status (TOS). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney U*).



Slika 47. Antioksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c.*) i oksima (5% LD₅₀, *i.m.*): a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD), b) totalni antioksidativni status (TAS) i c) ukupne -SH grupe. *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, *p<0,05, **p<0,01, t (0,05<p<0,1) (*Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U*).



Slika 48. Indeks oksidativnog stresa (OSI) u mozgu mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c.*) i oksima (5% LD₅₀, *i.m.*). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost, unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U*).



Slika 49. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u mozgu mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c*) i oksima (5% LD₅₀, *i.m*): a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost, unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney U*).

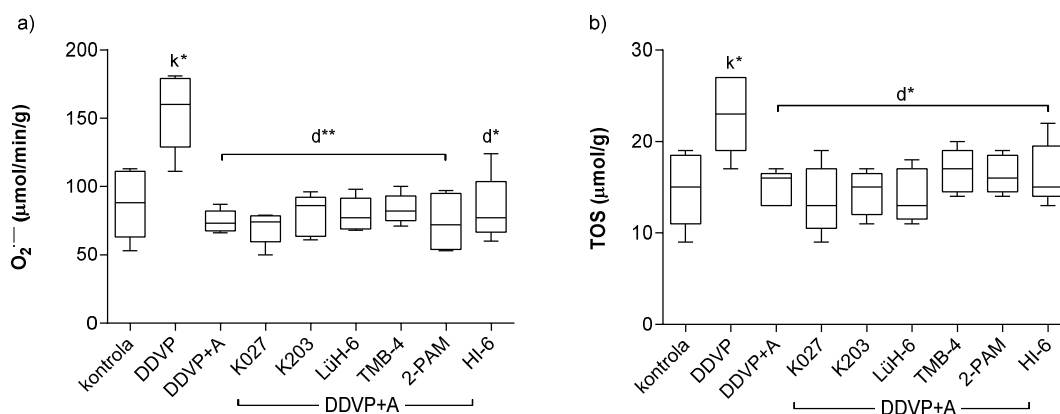
Atropin dat samostalno je smanjio značajno povišene nivoe prooksidanasa O₂^{·-} i TOS, usled dejstva DDVP-a, na kontrolne vrednosti, a isti efekat je zabeležen i na nivou MDA (Slika 50 i 53a). Međutim, atropin dat samostalno nije uticao na značajno smanjen TAS i povišen OSI kod DDVP-u izložene grupe životinja (p=0,675 i p= 0,249, redom) (Slika 51b i 52).

Kombinacija atropina i svakog od ispitivanih oksima, smanjila je visoke vrednosti O₂^{·-} i TOS usled dejstva DDVP-a na nivo kontrole (Slika 50). Sa druge strane, značajno nizak nivo TAS kod DDVP-grupe životinja nije uspela da poboljša nijedna kombinacija oksima sa atropinom (Slika 51b). Značajnih razlika nije bilo ni na nivou aktivnosti SOD, ni ukupnih –SH grupa, sa izuzetkom efekata pralidoksima i azoksima koji su u kombinaciji sa atropinom dali nivoe ukupnih –SH grupa značajno više od kontrolne i atropinom tretirane grupe životinja (Slika 51a i c).

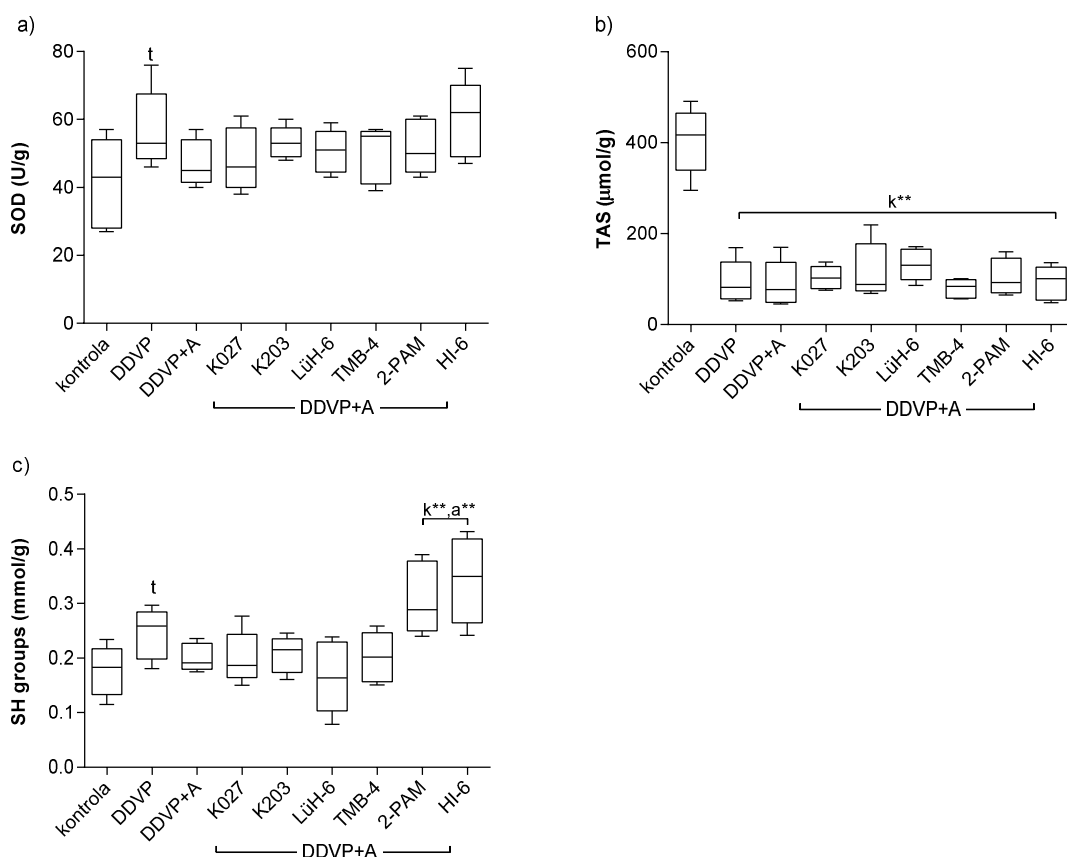
Visoka vrednost OSI kod DDVP-u izloženih životinja bila je značajno snižena jedino nakon terapije kombinacijama oksima K027 i obidoksima sa atropinom, s tim da te vrednosti nisu bile na nivou netretirane kontrole (Slika 52).

Oksimi K027, K203, trimedoksim i pralidoksim dati sa atropinom značajno su smanjili povišen nivo MDA u mozgu pacova trovanih DDVP-om, na nivoe jednake

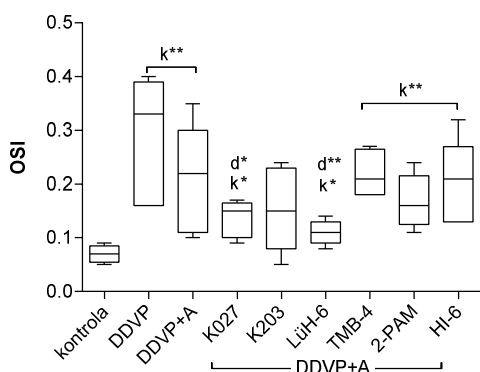
kontrolnim vrednostima (Slika 53a). Jedino je kombinacija oksima K203 i atropina dala nivoe AOPP-a značajno niže od onih kod DDVP-om tretirane grupe životinja (Slika 53b).



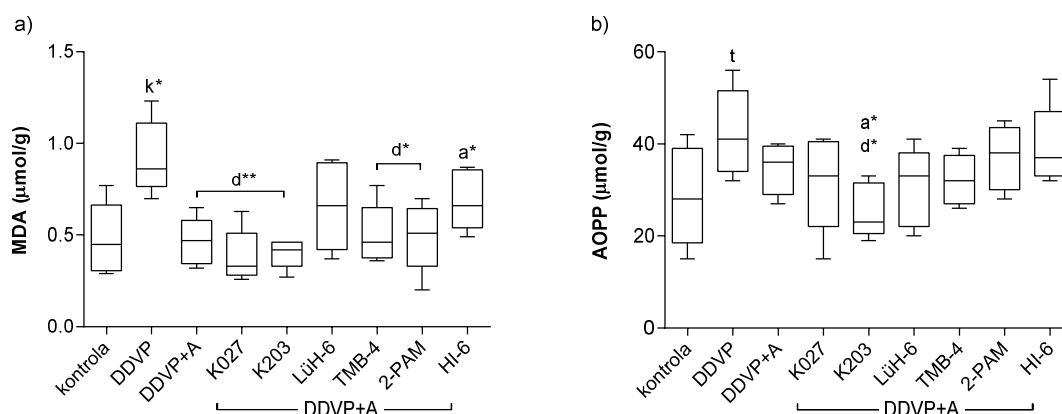
Slika 50. Prooksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD_{50} , *s.c.*), oksima (5% LD_{50} , *i.m.*) i atropina (A, 10 mg/kg, *i.m.*): a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot -}$) i b) totalni oksidativni status (TOS). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (*Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney U*).



Slika 51. Antioksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, s.c), oksima (5% LD₅₀, i.m) i atropina (A, 10 mg/kg, i.m): a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD), b) totalni antioksidativni status (TAS) i c) ukupne – SH grupe. *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U*).



Slika 52. Indeks oksidativnog stresa (OSI) u mozgu mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, s.c), oksima (5% LD₅₀, i.m) i atropina (A, 10 mg/kg, i.m). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost, unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U*).



Slika 53. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u mozgu mužjaka *Wistar* pacova 60 minuta nakon davanja DDVP-a (75% LD₅₀, *s.c.*), oksima (5% LD₅₀, *i.m.*) i atropina (A, 10 mg/kg, *i.m.*): a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP). *Box* predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu, a krajevi gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost, unutar grupe (n=5). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, *p<0,05, **p<0,01 (*Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney U*).

Analiza uticaja atropina na antioksidativni efekat samostalno datih oksima u mozgu pacova trovanih DDVP-om (Tabela 16) pokazala je da oksim K027 i obidoksim daju nivoe O₂^{•-} jednake kontrolnim nivoima tek u kombinaciji sa atropinom. Takođe, povišen TOS u mozgu pacova smanjen je na kontrolni nivo kombinacijom oksima K027 i atropina. Međutim, nakon uključivanja atropina u terapiju, oksim K027, K203, obidoksim i trimedoksim dali su značajno niže vrednosti TAS, koje su ostale jednake nivoima kod DDVP-grupe. Dodatno, oksim K027 i obidoksim, koji su samostalno dali OSI vrednosti jednake kontroli, uz atropin su dali značajno više vrednosti, s tim da su one i dalje bile značajno niže od OSI kod DDVP-grupe životinja.

Tabela 16. Uticaj atropina (10 mg/kg, *i.m.*) na antioksidativni efekat oksima (5% LD₅₀, *i.m.*) u mozgu pacova trovanih DDVP-om (75% LD₅₀, *s.c.*).

Terapija	Biomarker	O ₂ ⁻	TOS	SOD	TAS	-SH gr.	OSI	MDA	AOPP
K027 vs. K027+A	p vrednost	0,009	0,036	0,076	0,009	0,347	0,009	0,295	0,175
	p značajnost	**↓	*↓	ns	**↓	ns	**↑	ns	ns
	veličina efekta (%)	83	66	/	83	/	83	/	/
K203 vs. K203+A	p vrednost	0,076	0,672	0,917	0,028	0,251	0,071	0,207	0,917
	p značajnost	ns	ns	ns	*↓	ns	ns	ns	ns
	veličina efekta (%)	/	/	/	69	/	/	/	/
LüH-6 vs. LüH-6+A	p vrednost	0,028	0,753	0,094	0,009	0,047	0,009	0,602	0,175
	p značajnost	*↓	ns	ns	**↓	*↓	**↑	ns	ns
	veličina efekta (%)	69	/	/	83	63	83	/	/
TMB-4 vs. TMB-4+A	p vrednost	0,028	0,399	0,402	0,047	0,917	0,045	0,016	0,527
	p značajnost	*↑	ns	ns	*↓	ns	*↑	*↑	ns
	veličina efekta (%)	69	/	/	63	3	64	76	/
2-PAM vs. 2-PAM+A	p vrednost	0,917	0,462	0,249	0,465	0,047	0,528	0,076	1,000
	p značajnost	ns	ns	ns	ns	*↑	ns	ns	ns
	veličina efekta (%)	/	/	/	/	63	/	/	/
HI-6 vs. HI-6+A	p vrednost	0,675	0,289	0,465	0,251	0,076	0,751	0,009	0,344
	p značajnost	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**↑	ns
	veličina efekta (%)	/	/	/	/	/	/	83	/

A – atropin; ns – nije značajno različito (p>0,05); značajno različito *(0,05>p>0,01), **(0,01>p>0,001); ↑povećanje, ↓smanjenje.

4.6. Antioksidativna efikasnost oksima K203 i K027 kod pacova trovanih dihlorvosom

4.6.1. Modeli dozne zavisnosti antioksidativnih efekata atropina i/ili oksima u plazmi

Antioksidativni efekat oksima K027 i K203 pokazan je na nivou svih biomarkera oksidativnog stresa u plazmi, sa izuzetkom efekta oksima K203 na aktivnost PON1 pri dve visoke testirane doze gde je dobijena aktivnost enzima jednaka onoj u DDVP-tretiranoj grupi (Slika 54-57).

Dozna zavisnost nije pokazana za efekte povećanja TAS, smanjenja ukupnih -SH grupa i smanjenja OSI u plazmi. Oba K-oksima su pri svim ispitivanim dozama vratila nivoe TAS i ukupnih -SH grupa na nivo kontrolne grupe životinja (najniža doza oksima K027 bila je 31 $\mu\text{mol/kg}$ i oksima K203 9 $\mu\text{mol/kg}$) (Slika 55a i b), dok je OSI bio na nivou kontrole pri višim ispitivanim dozama oksima K027 (632 $\mu\text{mol/kg}$ i 1264 $\mu\text{mol/kg}$), a za oksim K203 na nivou kontrole pri dozi 35 $\mu\text{mol/kg}$ i višim (Slika 56b). Iako tretman DDVP-om nije narušio nivo PAB u plazmi, jedine značajno niže vrednosti dobijene su pri dozama 63 $\mu\text{mol/kg}$ za oksim K027 i 9 $\mu\text{mol/kg}$, 17 $\mu\text{mol/kg}$ za oksim K203 (Slika 56a).

Dozna zavisnost dobijena je za efekte smanjenja $\text{O}_2^{\cdot-}$ i TOS (Slika 54), zatim smanjenja MDA i AOPP (Slika 57), a oksim K027 pokazao je dozno zavisni efekat povećanja aktivnosti PON1 (Slika 55d).

Dozna zavisnost smanjenja $\text{O}_2^{\cdot-}$, TOS, povećanja PON1 i smanjenja AOPP bila je opisana petoparametarskim modelom, dok je dozno zavisno smanjenje MDA opisivao troparametarski model (Tabela 17). Osim za efekat smanjenja TOS, za sve dozno zavisne antioksidativne efekte dobijena je značajna razlika u parametru *b* krivih koje pripadaju oksimima K203 i K027, pokazujući njihovu različitu potentnost u plazmi (Tabela 17).

Među dozno zavisnim efektima, najveći kapacitet K-oksima su pokazali za efekat smanjenja AOPP (7,3 puta), zatim smanjenja TOS (5,2 puta), dok su kapaciteti oksima za smanjenje $\text{O}_2^{\cdot-}$ i MDA bili približno jednaki (3,3 i 3,6 puta, redom).

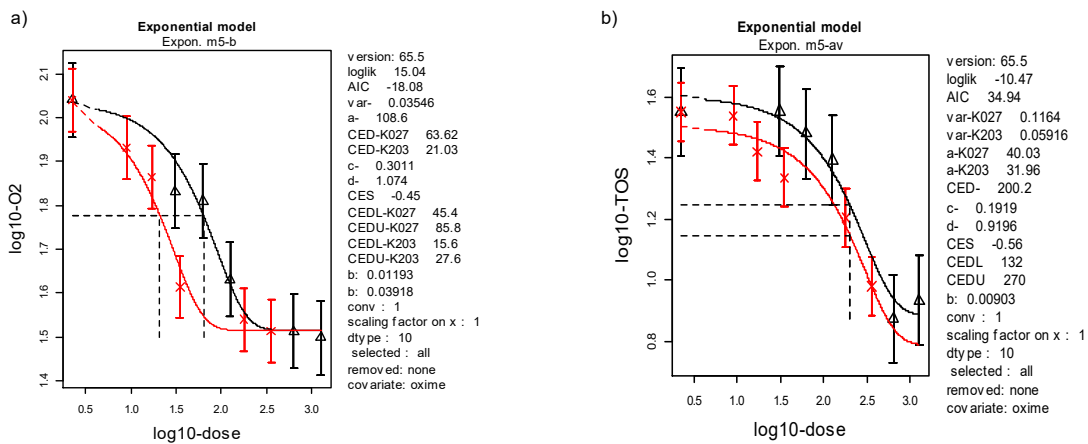
Najmanji kapacitet se uočava za efekat povećanja aktivnosti PON1 oksimom K027 (2,2 puta).

Najveća promena efekta u funkciji doze uočava se za efekat povećanja PON1 oksimom K027 i smanjenja AOPP K-oksimuma ($d=4$), dok manje i jednake promena efekta u funkciji doze imaju krive smanjenja $O_2^{\cdot-}$ i TOS ($d=1$), a najmanji kriva smanjenja MDA ($d=0,6$).

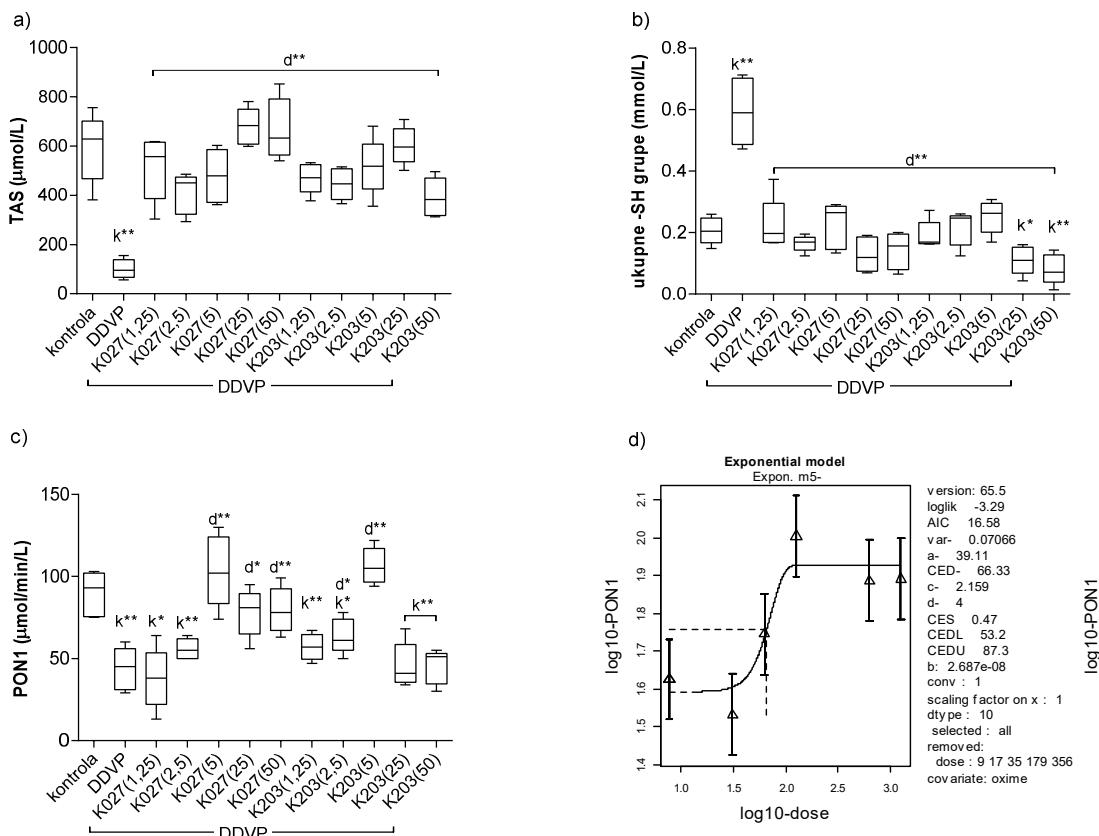
U pogledu jakog i umerenog intenziteta efekta, najosetljiviji efekat K-oksimuma je smanjenje $O_2^{\cdot-}$ ($CE_{D45-K027}=64 \mu\text{mol/kg}$, $CE_{D45-K203}=21 \mu\text{mol/kg}$) a za oksimum K027 i povećanje PON1 ($CE_{D47-K027}=66 \mu\text{mol/kg}$). Više i približne doze oksimuma K203 dovele su do smanjenja MDA i AOPP jakog intenziteta ($CE_{D-K203}=77/86 \mu\text{mol/kg}$) (Tabela 18). Značajno viša i jednaka doza K-oksimuma bila je potrebna za efekat smanjenja TOS ($CE_{D56}=200 \mu\text{mol/kg}$), dok su najviše doze bile neophodne za smanjenje MDA ($CE_{D30-K027}=581 \mu\text{mol/kg}$) i AOPP ($CE_{D57-K027}=710 \mu\text{mol/kg}$) oksimumom K027 (Tabela 18).

Najpreciznije CED dobijene su za efekat smanjenja AOPP, zatim povećanje PON1 (oksim K027), manje precizne za smanjenje $O_2^{\cdot-}$ i TOS, a najmanja preciznost je bila u proceni kritičnih doza za efekat smanjenja MDA (Tabela 18).

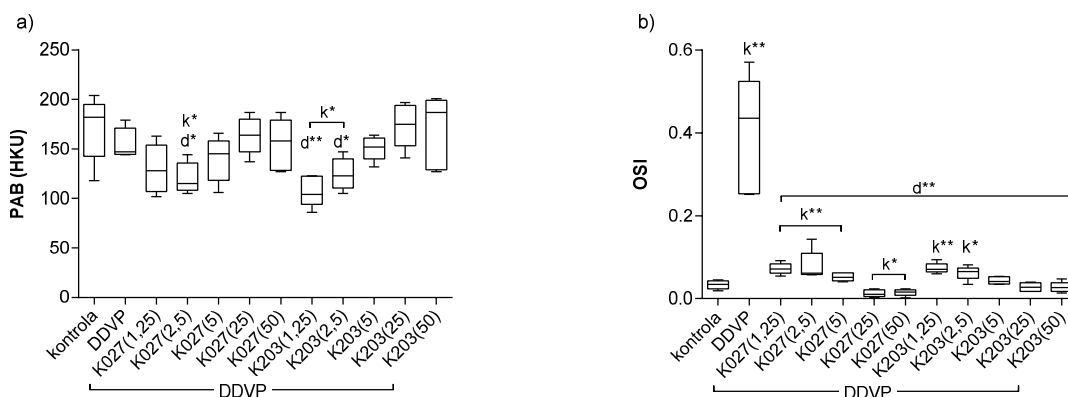
Na osnovu vrednosti RPF bolja antioksidativna potentnost oksimuma K203 uočava se na nivou efekata smanjenja $O_2^{\cdot-}$, kao i smanjenja MDA i AOPP (Tabela 18). Razlika u potentnosti dva oksimuma je bila najveća za smanjenje MDA (8,769 puta, ali značajna za jak intenzitet efekta), a manja razlika u potentnosti je dobijena za efekte smanjenja $O_2^{\cdot-}$ i AOPP ($RPF_{K203}=3,026$ i $2,380$, redom).



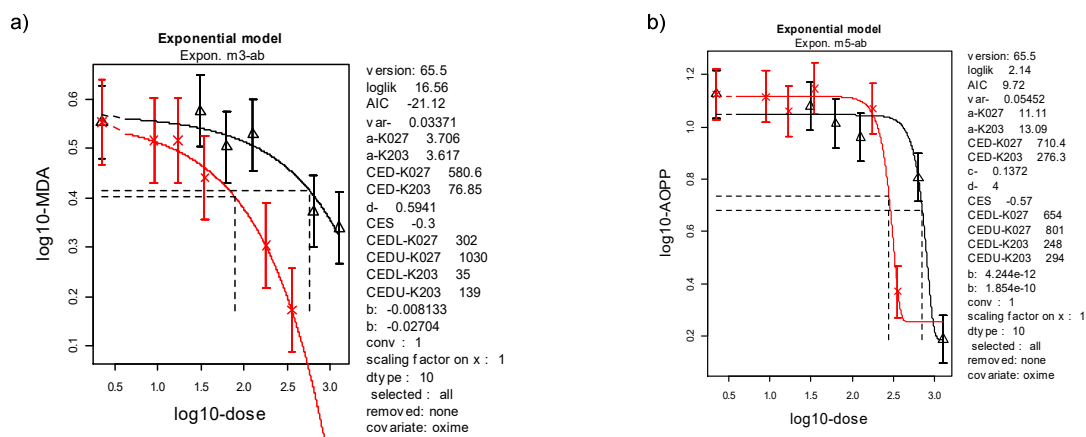
Slika 54. Prooksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva): a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot -}$) i b) totalni oksidativni status (TOS).



Slika 55. Antioksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027: a) totalni antioksidativni status (TAS), b) ukupne -SH grupe, c) aktivnost paraoksidaze PON1 za oksim K203 i d) aktivnost paraoksidaze PON1 za oksim K027.



Slika 56. Prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) (a) i indeks oksidativnog stresa (OSI) (b) u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027.



Slika 57. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva): a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP).

Tabela 17. Parametri modela dozne zavisnosti efekata oksima K203 i K027 na biomarkere redoks statusa u plazmi pacova

Biomarker	AIC _{full}	AIC _{min}	D-E trend	Model	Oksim	Parametri modela					M			CES (%)		
						var	a	b	c	d	n-puta	M=1/c	M=c	%	Jak	Umeren
O₂^{-•}	-13,16	-18,08	da ↓	E5-b	K027	0,03546	108,6	0,03918	0,3011	1,074	3,321	0,3	-70	-45	-26	-14
					K203					0,01193						
TOS	41,52	34,94	da ↓	E5-av	K027	0,1164	40,03	0,00903	0,1919	0,920	5,211	0,2	-81	-56	-34	-19
					K203	0,05916	31,96									
PON1	15,78	16,58	da ↑	E5	K027	0,07066	39,11	2,69E-08	2,159	4,000	/	2,2	116	47	21	10
					/											
MDA	-10,94	-21,12	da ↓	E3-ab	K027	0,03371	3,706	-0,02704	0,2766	0,594	3,615	0,5	-51	-30	-16	-8
					K203		3,617	-0,00813								
AOPP	10,86	9,72	da ↓	E5-ab	K027	0,05452	11,11	1,85E-10	0,1372	4,000	7,289	0,2	-81	-57	-34	-19
					K203		13,09	4,24E-12								

D-E trend, doza-efekat trend; ↓ smanjenje, ↑ povećanje; M-maksimalna veličina efekta; CES-engl. *critical effect size*, veličina kritičnog efekta.

Tabela 18. Doze kritičnih efekata oksima (engl. *critical effect dose*, CED) K203 i K027 na biomarkere redoks statusa u plazmi pacova, mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) i relativni faktor potentnosti (RPF)

Biomarker	Oksim	CED ($\mu\text{mol/kg}$)									CEDU/CEDL odnos			RPF _{K203}
		Jak			Umeren			Slab			Jak	Umeren	Slab	
		CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU				
O₂^{•-}	K027	64	45	86	30	17	47	16	8	29	1,9	2,8	3,6	3,026
	K203	21	16	28	10	6	15	6	3	10	1,8	2,5	3,3	
TOS	K027	200	132	270	87	40	150	40	12	92	2,0	3,8	7,7	/
	K203													
PON1	K027	66	53	87	52	39	68	43	29	56	1,6	1,7	1,9	/
	K203													
MDA	K027	581	302	1030	174	62	387	50	11	160	3,4	6,2	14,5	8,769
	K203	77	35	139	23	7	60	7	1,2	26	4,0	8,6	21,7	
AOPP	K027	710	654	801	586	536	657	492	435	551	1,2	1,2	1,3	2,380
	K203	276	248	294	228	198	243	191	159	204	1,2	1,2	1,3	

Antioksidativni efekat rastućih doza oksima K027 i K203 datih sa atropinom pokazan je u plazmi efektima smanjenja $O_2^{\cdot -}$, povećanja TAS, smanjenja ukupnih –SH grupa i smanjenja OSI i za ove biomarkere nije bio dozno zavistan (Slika 58a, 59a i b, 60b). Tačnije, date sa atropinom, sve ispitivane doze oba K-oksima značajno su uticale na nivoe navedenih biomarkera, narušene dejstvom DDVP-a, a nivoe $O_2^{\cdot -}$ i TAS vratile na nivo kontrole. Ukupne –SH grupe i OSI smanjeni su na nivo kontrole pri višim dozama oksima K203 (179 $\mu\text{mol/kg}$ i 356 $\mu\text{mol/kg}$). Oksim K027 smanjio je ukupne –SH grupe na nivo kontrole, takođe, pri višim dozama (632 $\mu\text{mol/kg}$ i 1264 $\mu\text{mol/kg}$), dok je OSI bio na nivou kontrole od doze 63 $\mu\text{mol/kg}$.

Antioksidativni efekat kombinacije oksima K027 i atropina pokazan je i smanjenjem TOS u plazmi na kontrolne vrednosti (Slika 58b). Smanjenje TOS u plazmi kombinacijom oksima K203 i atropina bilo je značajno samo pri višim ispitivanim dozama oksima K203 (179 $\mu\text{mol/kg}$ i 356 $\mu\text{mol/kg}$), kada je vraćeno na kontrolni nivo.

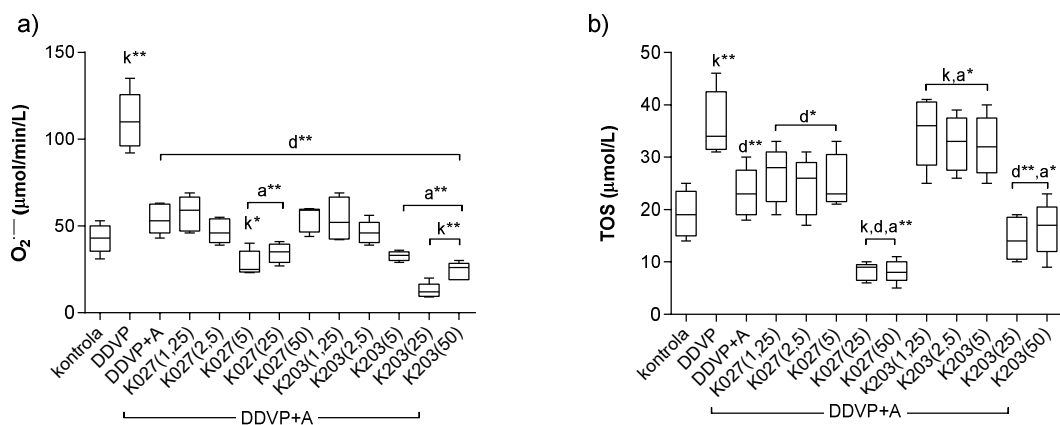
Aktivnost PON1 u plazmi pacova trovanih DDVP-om, bila je jednaka ili čak viša od kontrolnih nivoa nakon davanja atropina i nižih doza oksima K027 (31-126 $\mu\text{mol/kg}$) i K203 (9-35 $\mu\text{mol/kg}$), ali je smanjena pri višim dozama K-oksima datim uz atropin, a za oksim K203 na nivo DDVP-grupe (Slika 59c).

Ispitivane doze K-oksima date sa atropinom nisu značajno uticale na nivo PAB u plazmi, čije nivoe nije značajno promenio ni DDVP, kao ni atropin dat samostalno (Slika 60a).

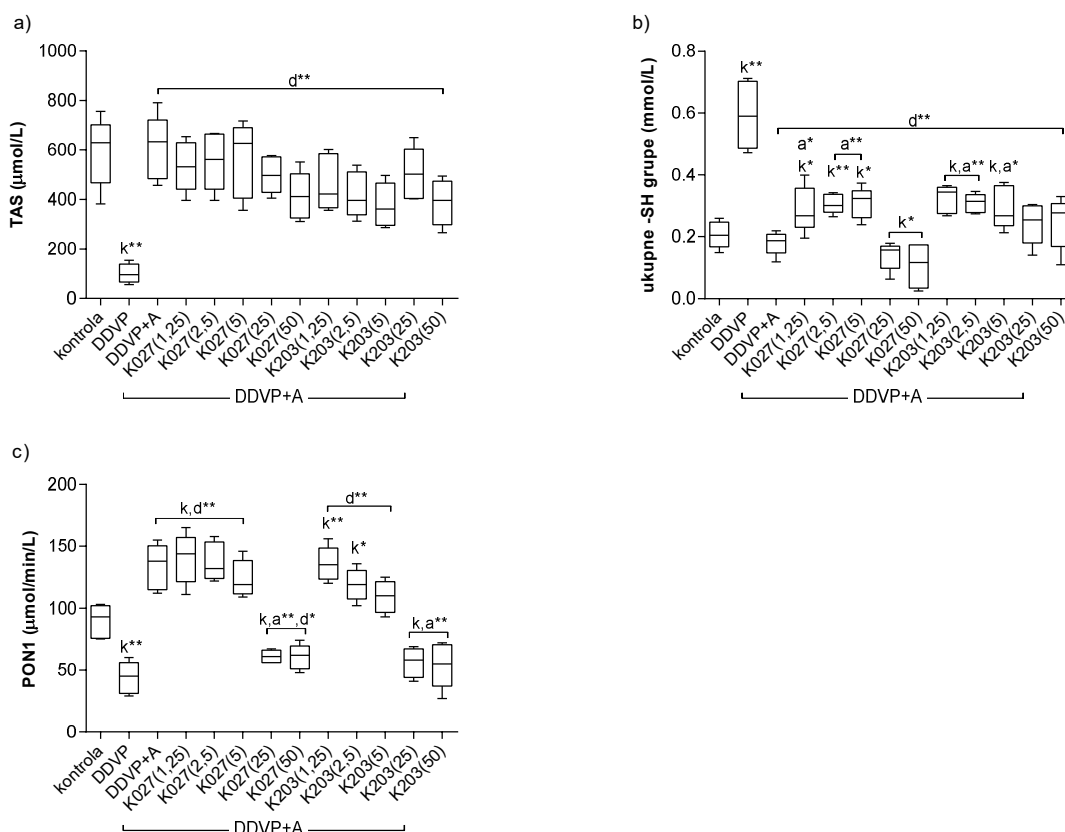
Nijedna doza oksima K027 data sa atropinom nije značajno uticala na nivoe MDA, kao ni AOPP, povišene u plazmi pacova trovanih DDVP-om (Slika 61a i c).

Nijedna doza oksima K203 data sa atropinom nije značajno uticala na povišene nivoe AOPP u plazmi pacova trovanih DDVP-om (Slika 61c). Međutim, ova terapija je dovela do dozno zavisnog smanjenja povišenih nivoa MDA do kontrolnih, koji je bio opisan petoparametarskim modelom (Slika 61b, Tabela 19 i 20).

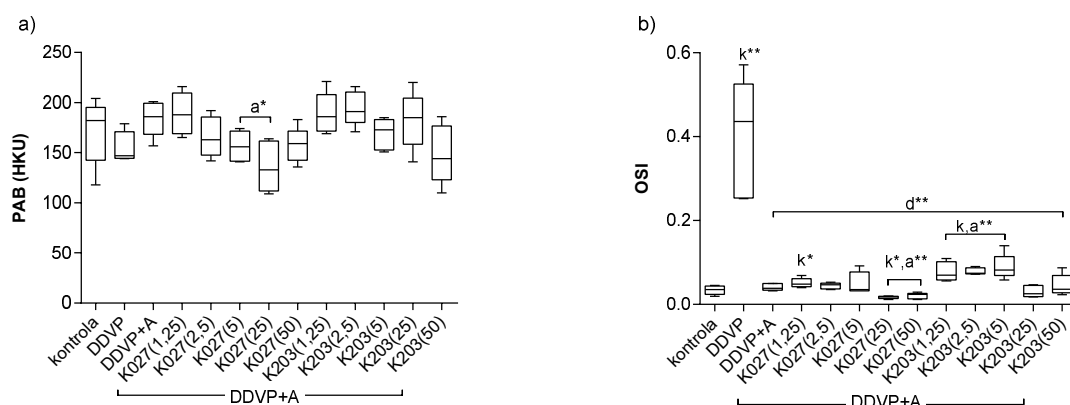
U pogledu ovog i ujedno jedino dobijenog dozno zavisnog efekta, uključivanje atropina u terapiju, dovelo je do redukcije doza oksima K203 2,6 puta neophodne za smanjenje MDA u plazmi jakog intenziteta (Tabela 18 i 20).



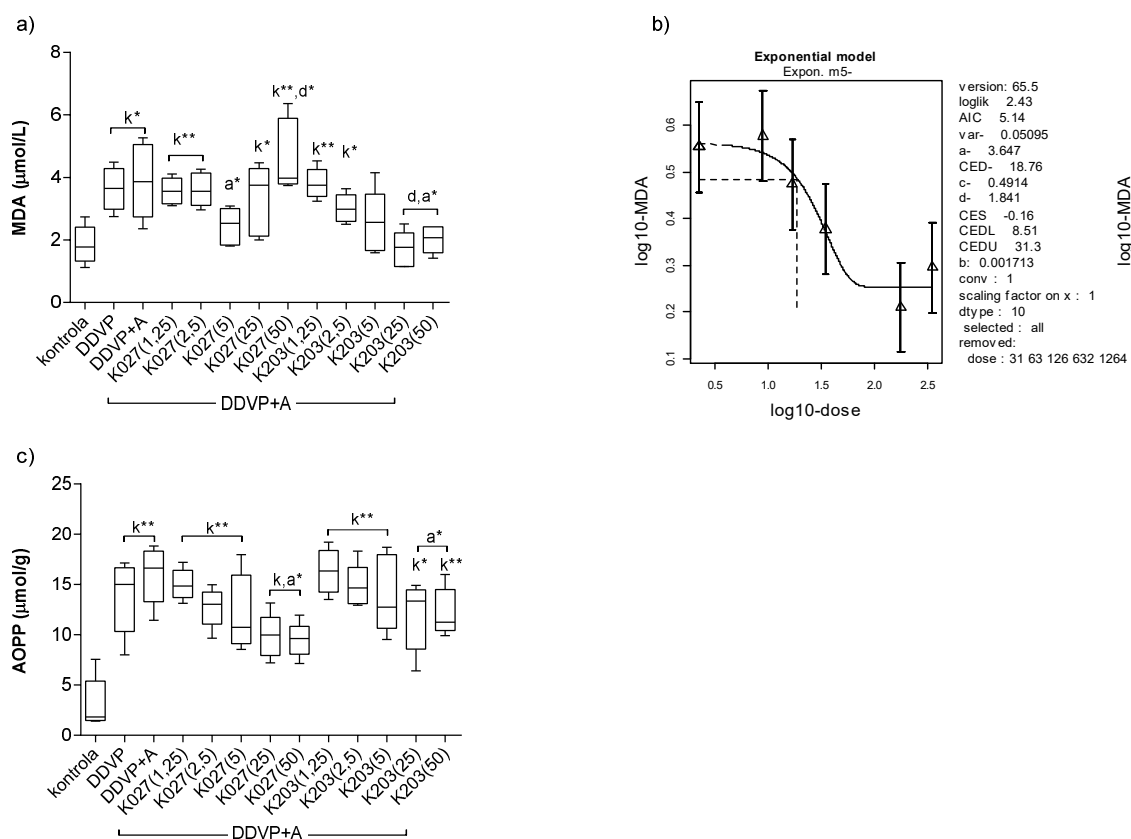
Slika 58. Prooksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A): a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) i b) totalni oksidativni status (TOS). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 59. Antioksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A): a) totalni antioksidativni status (TAS), b) ukupne -SH grupe, c) aktivnost paraoksonaze (PON1). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 60. Prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) (a) i indeks oksidativnog stresa (OSI) (b) u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 61. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u plazmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A): a) malondialdehid (MDA), b) malondialdehid (MDA) za oksim K203, c) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).

Tabela 19. Parametri modela dozne zavisnosti efekata oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A) na biomarkere redoks statusa u plazmi pacova

Biomarker	AIC _{full}	AIC _{min}	D-E trend	Model	Oksim	var	Parametri modela				M n-puta M=c	CES (%)					
							a	b	c	d		M=1/c	%	Jak	Umeren	Slab	
MDA					/												
<i>a</i> =DDVP	8,02	5,14	da↓	E5	K203+A	0,05095	3,647	1,71E-03	0,4914	1,841	2,035	0,5	-51	-30	-16	-8	

D-E trend, doza-efekat trend; ↓ smanjenje; M-maksimalna veličina efekta; CES-engl. *critical effect size*, veličina kritičnog efekta.

Tabela 20. Doze kritičnih efekata oksima (engl. *critical effect dose*, CED) K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A) na biomarkere redoks statusa u plazmi pacova, mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) i relativni faktor potentnosti (RPF)

Biomarker	Oksim	CED (μmol/kg)									CEDU/CEDL odnos			RPF _{K203}		
		Jak			Umeren			Slab			Jak	Umeren	Slab			
		CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU						
MDA	/															
<i>a</i> =DDVP	K203+A	30	19	51	19	9	31	12	4	26	2,7	3,4	6,5	/		

4.6.2. Modeli dozne zavisnosti antioksidativnih efekata atropina i/ili oksima u dijafragmi

Antioksidativni efekat oksima K027 i K203 u dijafragmi pokazan je na nivou svih biomarkera oksidativnog stresa, sa izuzetkom AOPP čije značajne promene u odnosu na netretirane kontrolne životinje nije dobijena ni primenom DDVP-a (Slika 62-65).

Dozna zavisnost je dobijena za efekat smanjenja $O_2^{\cdot -}$, povećanja TAS i smanjenja MDA (Slika 62a, 63a, 65a i Tabela 21), dok je značajno smanjenje TOS i ukupnih -SH grupa dobijeno je na nivou svih testiranih doza oksima K203 i K027 (najniža doza oksima K027 bila je 31 $\mu\text{mol/kg}$, a oksima K203 9 $\mu\text{mol/kg}$) (Slika 62b i 63b).

Indeks oksidativnog stresa, kao rezultat odnosa TOS i TAS, nije zadovoljio kriterijum dozne zavisnosti, međutim oba oksima su u opsegu nižih doza (31-126 $\mu\text{mol/kg}$ za oksim K027, 9-35 $\mu\text{mol/kg}$ za oksim K203) značajno smanjile njegovu vrednost u odnosu na DDVP, dok su dve najviše testirane doze (632 $\mu\text{mol/kg}$ i 1264 $\mu\text{mol/kg}$ za oksim K027, 179 $\mu\text{mol/kg}$ i 356 $\mu\text{mol/kg}$ za oksim K203), ovo smanjenje dovele na nivo kontrolnih vrednosti (Slika 64).

Dozno zavisno smanjenje $O_2^{\cdot -}$ oksimima K203 i K027 u dijafragmi bilo je opisano troparametarskim, dok povećanje TAS i smanjenje MDA petoparametarskim modelima sa značajnom razlikom u parametru b krivih za sva tri biomarkera (Slika 62a, 63a, 65a i Tabela 21).

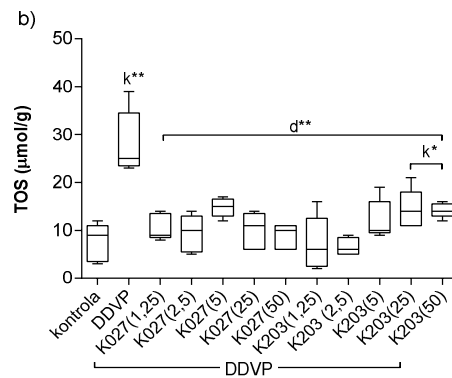
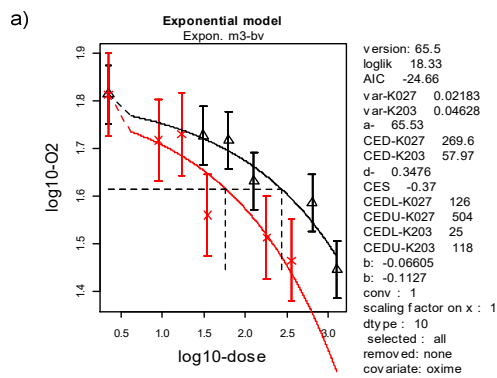
Najveći maksimalni efekat oksima se uočava na nivou TAS sa povećanjem od 15-puta u odnosu na DDVP-tretiranu grupu, zatim na nivou MDA sa smanjenjem 5,7-puta i najmanji maksimalni efekat uočava se za efekat smanjenja $O_2^{\cdot -}$ od 2,4-puta (Tabela 21). Ove veličine maksimalnih efekata oksima su jednake veličini promene koju je ostvario sam DDVP u odnosu na netretiranu grupu životinja, što znači da su K-oksimi dozno zavisno vratili nivoe pomenutih biomarkera na nivo kontrole.

Najveća promena efekta u funkciji doze dobijena je za efekat smanjenja MDA u dijafragmi pacova od $d=3,108$, zatim za efekat povećanja TAS $d=2,101$, a najmanja za efekat smanjenja $O_2^{\cdot -}$ $d=0,348$ (Tabela 21).

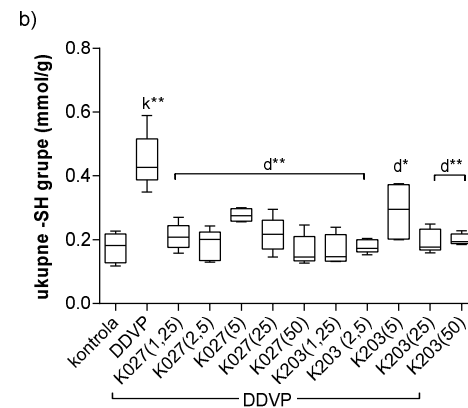
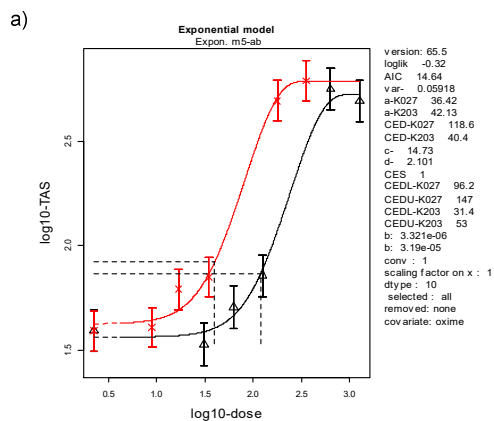
Najosetljiviji efekat K-oksima, za umeren i slab intenzitet efekta u dijafragmi, je smanjenje $O_2^{\cdot -}$, a doze kritičnog efekta su: $CE_{D20-K027}=33 \mu\text{mol/kg}$, $CE_{D20-K203}=7 \mu\text{mol/kg}$ i $CE_{D11-K027}=5 \mu\text{mol/kg}$ i $CE_{D11-K203}=1 \mu\text{mol/kg}$ (Tabela 22). Najosetljiviji efekat K-oksima, za efekat jakog intenziteta u dijafragmi, je smanjenje MDA, a doze kritičnog efekta su: $CE_{D58-K027}=113 \mu\text{mol/kg}$ i $CE_{D58-K203}=34 \mu\text{mol/kg}$. Više doze oksima su bile potrebne za povećanje TAS jakog intenziteta u odnosu na smanjenje MDA dijafragmi $CE_{D287-K027}=203 \mu\text{mol/kg}$, $CE_{D287-K203}=69 \mu\text{mol/kg}$, dok se doze za postizanje efekta umerenog i slabog intenziteta za ova dva biomarkera mogu smatrati bliskim: za TAS $CE_{D97-K027}=117 \mu\text{mol/kg}$, $CE_{D97-K203}=40 \mu\text{mol/kg}$ i $CE_{D40-K027}=76 \mu\text{mol/kg}$ i $CE_{D40-K203}=26 \mu\text{mol/kg}$; za MDA $CE_{D35-K027}=88 \mu\text{mol/kg}$, $CE_{D35-K203}=26 \mu\text{mol/kg}$ i $CE_{D20-K027}=71 \mu\text{mol/kg}$ i $CE_{D20-K203}=21 \mu\text{mol/kg}$.

Bolja preciznost izračunatih CED dobijena je za biomarkere TAS i MDA u odnosu na $O_2^{\cdot -}$ (Tabela 22).

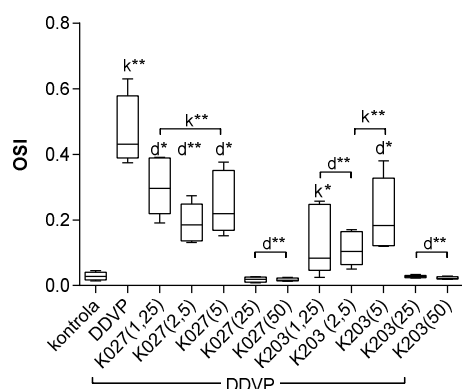
Na osnovu vrednosti RPF uočava se veća potentnost oksima K203 u odnosu na oksim K027 u uticaju na redox biomarkere dijafragme (Tabela 22). Razlika u potentnosti oksima je najveća za efekat smanjenja $O_2^{\cdot -}$ ($RPF_{K203}=5,938$), ali preklapanje intervala pouzdanosti doza dva oksima ne postoji jedino na nivou efekta jakog intenziteta. Za efekat povećanja TAS i smanjenja MDA vrednosti potentnosti oksima K203 u odnosu na oksim K027 su približno jednake i iznose $RPF_{K203}=3,600$ i $3,364$, redom, a intervali pouzdanosti doza dva oksima se ne preklapaju ni na jednom od posmatranih intenziteta efekata.



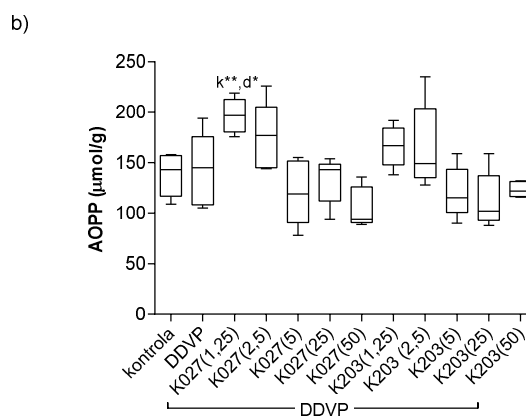
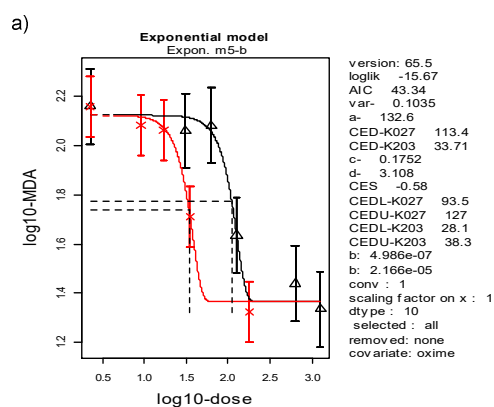
Slika 62. Prooksidativni biomarkeri u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027: a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot -}$) za oksim K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva) i b) totalni oksidativni status (TOS). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 63. Antioksidativni biomarkeri u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027: a) totalni antioksidativni status (TAS) za oksim K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva), b) ukupne -SH grupe. Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 64. Indeks oksidativnog stresa (OSI) u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om) u funkciji doze oksima K203 i K027. Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 65. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027: a) malondialdehid (MDA) za oksim K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva), b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).

Tabela 21. Parametri modela dozne zavisnosti efekata oksima K203 i K027 na biomarkere redoks statusa u dijafragmi pacova

Biomarker	AIC _{full}	AIC _{min}	D-E trend	Model	Oksim	Parametri modela					M			CES (%)		
						var	a	b	c	d	n-puta	M=c	%	Jak	Umeren	Slab
O ₂ ^{••}	-18,72	-24,66	da ↓	E3-bv	K027	0,02183	65,53	-0,1127	/	0,348	2,4	0,4	-60	-37	-20	-11
					K203	0,04628										
TAS	14,54	14,64	da ↑	E5-ab	K027	0,05918	36,42	3,19E-05	14,73	2,101	/	15,0	1400	287	97	40
					K203		42,13	3,32E-06								
MDA	51,16	43,34	da ↓	E5-b	K027	0,1035	132,6	2,17E-05	0,175	3,108	5,7	0,2	-83	-58	-35	-20
					K203			4,99E-07								

D-E trend, doza-efekat trend; ↓ smanjenje, ↑ povećanje; M-maksimalna veličina efekta; CES-engl. *critical effect size*, veličina kritičnog efekta.

Tabela 22. Doze kritičnih efekata oksima (engl. *critical effect dose*, CED) K203 i K027 na biomarkere redoks statusa u dijafragmi pacova, mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) i relativni faktor potentnosti (RPF)

Biomarker	Oksim	CED (μmol/kg)									Odnos CEDU/CEDL			RPF _{K203}
		Jak			Umeren			Slab			Jak	Umeren	Slab	
		CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU				
O ₂ ^{••}	K027	270	126	504	33	9	99	5	1	24	4,0	11,0	24,0	
	K203	58	25	118	7	2	23	1	0	6	4,7	11,5	38,0	5,938
TAS	K027	203	170	245	117	95	145	76	59	98	1,4	1,5	1,7	
	K203	69	55	88	40	31	52	26	19	35	1,6	1,7	1,8	3,600
MDA	K027	113	94	127	88	60	104	71	39	88	1,4	1,7	2,3	
	K203	34	28	38	26	18	31	21	12	26	1,4	1,7	2,2	3,364

Kada su rastuće doze oksimi K027 i K203 date sa atropinom antioksidativni efekat u dijafragmi je pokazan na nivou svih biomarkera oksidativnog stresa, sa izuzetkom AOPP čije značajne promene u odnosu na netretirane kontrolne životinje nije izazvao ni DDVP, kao ni terapija samo atropinom (Slika 66-69).

Dozna zavisnost nije pokazana za efekat smanjenja $O_2'^-$ kombinacijom oksima K027 i atropina, kao ni za efekat smanjenja TOS. Sve ispitivane doze oksima K027 sa atropinom značajno su smanjile DDVP-om povišene nivoe $O_2'^-$, pri čemu su nivoi ovog biomarkera bili jednaki nivou koji dala terapija samo atropinom (Slika 66a). Sve ispitivane doze K-oksima date sa atropinom značajno su smanjenjile TOS u dijafragmi na nivo kontrole (Slika 66c).

Dozna zavisnost je dobijena za efekat smanjenja $O_2'^-$, ali samo za kombinaciju oksima K203 i atropina (Slika 66), a za oba K-oksima data sa atropinom za efekte povećanja TAS, smanjenja ukupnih -SH grupa, smanjenja OSI i konačno za efekat smanjenja MDA (Slika 67, 68 i 69a).

Dozna zavisnost efekata smanjenja $O_2'^-$, povećanja TAS, smanjenja OSI i MDA bila je opisana petoparametarskim modelima (Tabela 23). S obzirom da je samostalno dat atropin značajno smanjio nivo ukupnih -SH grupa, ali ne i na nivo kontrole, dozna zavisnost efekta smanjenja ukupnih -SH grupa kombinacijama K-oksima sa atropinom bila je opisna troparametarskim modelom u slučaju kada je za efekat pri nultoj dozi postavljen efekat DDVP-a ($a=DDVP$), a petoparametarskim kada je za efekat pri nultoj dozi postavljen efekat DDVP-a sa atropinom ($a=DDVP+A$) (Tabela 23).

Za sve biomarkere redoks statusa u dijafragmi koji su pokazali doznu zavisnost vrednost parametra b krivih koje pripadaju oksimima K027 i K203 datim sa atropinom je bila značajno različita (Tabela 23).

Najveći kapacitet K-oksima (Tabela 23) datih sa atropinom u dijafragmi se uočava na nivou TAS sa povećanjem od 13-puta i OSI sa smanjenjem 12-puta (za $a=DDVP+atropin$). Zatim makismalni efekat smanjenja MDA u dijafragmi K-oksimuma sa atropinom iznosi 7,5-puta, dok se najniži i gotovo identični maksimalni efekti uočavaju za efekte smanjenja $O_2'^-$ (oksim K203+atropin) i ukupnih -SH grupa značajno povišenih u dijafragmi pacova trovanih DDVP-om (2,5 prema 2,6-puta za $a=DDVP$, redom, odnosno 1,8-puta za oba biomarkera za $a=DDVP+atropin$).

Ukoliko se posmatraju efekti K-oksima datih sa atropinom za $a=DDVP$, najveću promenu efekta u funkciji doze imaju krive smanjenja TAS ($d=2,307$), pa zatim smanjenja MDA ($d=1,607$), smanjenja $O_2^{\cdot -}$ (oksim K203+atropin, $d=0,856$), a najmanju efekat smanjenja ukupnih -SH grupa ($d=0,317$) (Tabela 23). Ukoliko se posmatraju promene efekta u funkciji doze za $a=DDVP+atropin$, najveće vrednosti se uočavaju za efekat smanjenja $O_2^{\cdot -}$ (oksim K203+atropin, $d=4$), zatim smanjenja ukupnih -SH grupa ($d=2,450$), dok je smanjenje OSI u funkciji doze oksima niže ($d=1,551$).

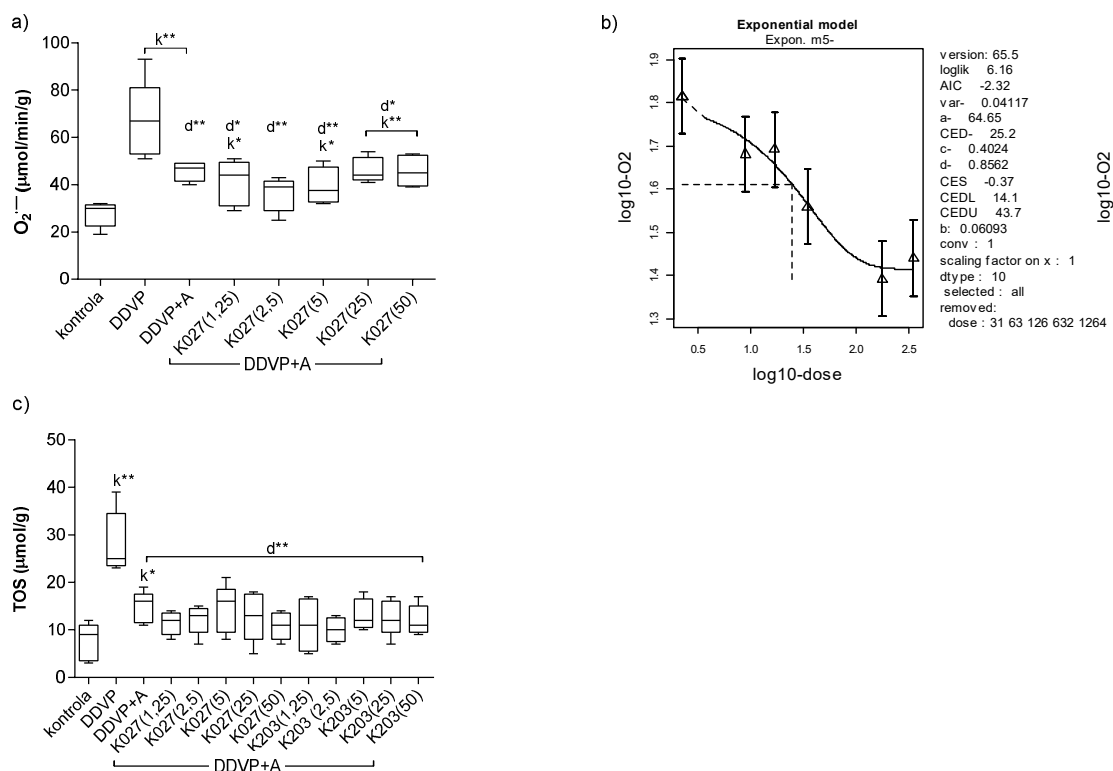
Najosetljiviji efekat oksima K203 datog sa atropinom u dijafragmi, za $a=DDVP$ i sva tri intenziteta dozno-zavisnih efekata, jeste smanjenje $O_2^{\cdot -}$ ($CE_{D37}=25 \mu\text{mol/kg}$) i smanjenje ukupnih -SH grupa ($CE_{D37}=29 \mu\text{mol/kg}$) (Tabela 24). Najosetljiviji efekat oksima K027 datog sa atropinom, za $a=DDVP$ i efekat jakog intenziteta, je povećanje TAS ($CE_{D261}=229 \mu\text{mol/kg}$), a za efekte umerenog i slabog intenziteta, smanjenje ukupnih -SH grupa ($CE_{D20}=38$ i $CE_{D11}=5 \mu\text{mol/kg}$) (Tabela 24).

Generalno posmatrano, uključivanje atropina u terapiju nije značajno promenilo maksimalne efekte K-oksima na redoks status u dijafragmi pacova trovanih DDVP-om, osim za efekat smanjenja MDA gde je uključivanje atropina dovelo do povećanja maksimalnog efekta oksima sa 5,7 na 7,5-puta (Tabela 21 i 23). Međutim, uključivanje atropina u terapiju dovelo je do povećanja veličine promene efekta u funkciji doze oksima za efekte smanjenja $O_2^{\cdot -}$ i povećanja TAS, ali i do smanjenja te veličine za opadajuće krive MDA biomarkera (d parametar krive, Tabela 21 i 23).

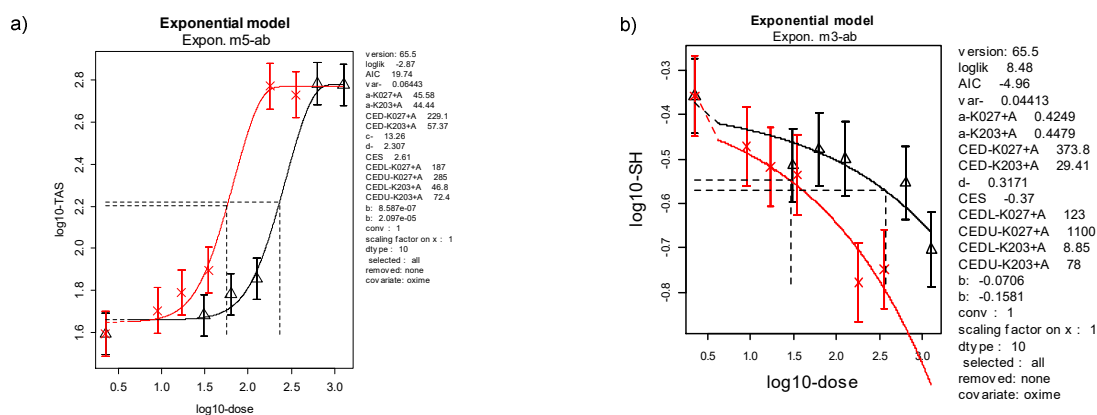
Uključivanje atropina u terapiju dovelo je do redukcije doza oksima K203 za efekat smanjenja $O_2^{\cdot -}$, manje redukcije za efekat povećanja TAS ali i do povećanja doza oba oksima za efekte smanjena ukupnih -SH grupa i naročito efekat smanjenja MDA (Tabela 22 i 24).

Na osnovu vrednosti RPF uočava se veća potentnost oksima K203 datog sa atropinom u odnosu na kombinaciju oksim K027 i atropin u uticaju na redoks biomarkere dijafragme (Tabela 24). Najveća vrednost RPF oksima K203 datog sa atropinom ($RPF_{K203}=10$) dobijena je za efekat smanjenja ukupnih -SH grupa u dijafragmi, ali se intervali pouzdanosti ne preklapaju samo na nivou jakog efekta.

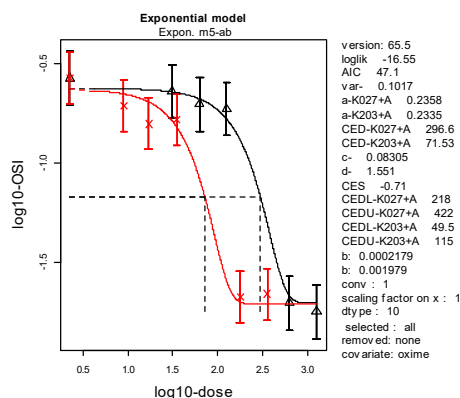
Uključivanje atropina u terapiju dovelo je do malog povećanja vrednosti RPF_{K203} za efekat povećanja TAS, ali i do smanjenja prednosti oksima K203 nad oksimom K027 za efekat smanjenja MDA u dijafragmi (Tabela 22 i 24).



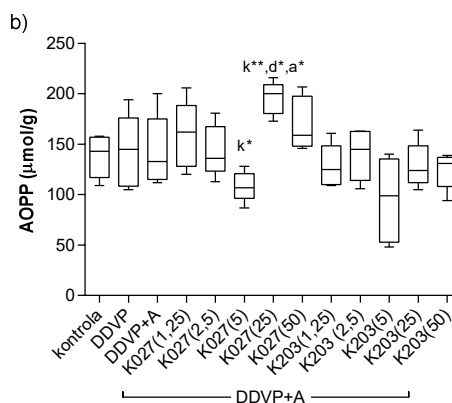
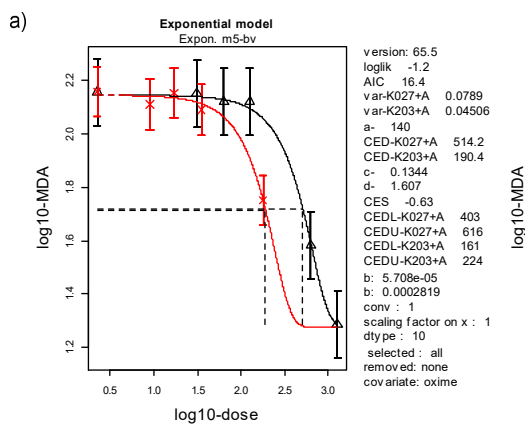
Slika 66. Prooksidativni biomarkeri u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova (trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A): a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot -}$) za oksim K027, b) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot -}$) za oksim K203 (trouglovi, crna kriva) i c) totalni oksidativni status (TOS). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 67. Antioksidativni biomarkeri u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva) primenjenih sa atropinom (A): a) totalni antioksidativni status (TAS), b) ukupne -SH grupe.



Slika 68. Indeks oksidativnog stresa (OSI) u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva) primenjenih sa atropinom (A).



Slika 69. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u dijafragmi mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A): a) malondialdehid (MDA) za oksim K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP), značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).

Tabela 23. Parametri modela dozne zavisnosti efekata oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A) na biomarkere redoks statusa u dijafragmi pacova

Biomarker	AIC _{full}	AIC _{min}	D-E trend	Model	Oksim	Parametri modela					M			CES (%)			
						var	a	b	c	d	n-puta	%	Jak	Umeren	Slab		
O₂^{•-}					/												
a=DDVP	1,16	-2,32	da ↓	E5	K203+A	0,04117	64,65	6,09E-02	0,4024	0,856	2,5	0,4	-60	-37	-20	-11	
O₂^{•-}					/												
a=DDVP+A	-9,14	-10,86	da ↓	E5	K203+A	0,02963	47,46	4,85E-07	0,5495	4,000	1,8	0,5	-45	-26	-14	-7	
TAS	21,00	19,74	da ↑	E5-ab	K027+A	0,06443	45,58	8,59E-07	13,26	2,307	/	13,0	1200	261	90	38	
a=DDVP					K203+A		44,44	2,10E-05									
TAS	27,08	18,36	da ↑	E5-ab	K027+A	0,06296	53,23	1,91E-06	11,12	2,885	/	11,0	1000	232	82	35	
a=DDVP+A					K203+A		52,21	3,27E-08									
-SH gr.	-1,20	-4,96	da ↓	E3-ab	K027+A	0,04413	0,4249	-0,1581	/	0,317	2,6	0,4	-60	-37	-20	-11	
a=DDVP					K203+A		0,4479	-0,0706									
-SH gr.	-1,76	-14,28	da ↓	E5-b	K027+A	0,03778	0,3188	3,62E-05	0,5406	2,450	1,8	0,5	-50	-29	-16	-8	
a=DDVP+A					K203+A			4,40E-08									
OSI	49,96	47,10	da ↓	E5-ab	K027+A	0,1017	0,2358	1,98E-03	0,083	1,551	12,0	0,1	-92	-71	-46	-27	
a=DDVP+A					K203+A			2,18E-04									
MDA	27,30	16,40	da ↓	E5-bv	K027+A	0,0789	140	2,82E-04	0,134	1,607	7,5	0,1	-87	-63	-39	-22	
a=DDVP					K203+A	0,04506		5,71E-05									
MDA	29,36	18,44	da ↓	E5-bv	K027+A	0,08094	134,3	1,98E-05	0,143	2,112	7,0	0,1	-86	-62	-39	-22	
a=DDVP+A					K203+A	0,0474		2,18E-06									

D-E trend, doza-efekat trend; ↓ smanjenje, ↑ povećanje; M-maksimalna veličina efekta; CES-engl. *critical effect size*, veličina kritičnog efekta.

Tabela 24. Doze kritičnih efekata oksima (engl. *critical effect dose*, CED) K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A) na biomarkere redoks statusa u dijafragmi pacova, mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) i relativni faktor potentnosti (RPF)

Biomarker	Oksim	CED ($\mu\text{mol/kg}$)									Odnos CEDU/CEDL			RPF _{K203}	
		Jak			Umeren			Slab			Jak	Umeren	Slab		
		CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU					
O₂^{••}	/														
<i>a</i> =DDVP	K203+A	25	14	44	9	3	19	4	1	12	3,1	6,3	12,0	/	
O₂^{••}	/														
<i>a</i> =DDVP+A	K203+A	37	31	55	30	21	38	24	13	31	1,8	1,8	2,4	/	
TAS	K027+A	229	187	285	140	109	181	95	70	131	1,5	1,7	1,9		
<i>a</i> =DDVP	K203+A	57	47	72	35	28	45	24	18	32	1,5	1,6	1,8	3,863	
TAS	K027+A	246	180	325	167	133	231	123	93	179	1,8	1,7	1,9		
<i>a</i> =DDVP+A	K203+A	60	46	81	41	33	54	30	23	40	1,8	1,6	1,7	3,988	
-SH gr.	K027+A	374	123	1100	38	7	151	5	1	32	8,9	21,6	32		
<i>a</i> =DDVP	K203+A	29	9	78	3	1	14	1	0	3	8,7	14,0	30	10,080	
-SH gr.	K027+A	1006	739	1310	712	418	1010	513	227	829	1,8	2,4	3,7		
<i>a</i> =DDVP+A	K203+A	65	41	145	46	28	116	33	16	95	3,5	4,1	5,9	15,500	
OSI	K027+A	297	218	422	182	119	320	116	65	251	1,9	2,7	3,9		
<i>a</i> =DDVP+A	K203+A	72	50	115	44	29	79	28	17	58	2,3	2,7	3,4	4,267	
MDA	K027+A	514	403	616	317	139	504	204	93	423	1,5	3,6	4,5		
<i>a</i> =DDVP	K203+A	190	161	224	118	78	161	75	78	135	1,4	2,1	1,7	2,728	
MDA	K027+A	540	427	621	379	232	514	270	125	430	1,5	2,2	3,4		
<i>a</i> =DDVP+A	K203+A	190	167	221	133	93	164	95	50	138	1,3	1,8	2,8	2,871	

4.6.3. Modeli dozne zavisnosti antioksidativnih efekata atropina i/ili oksima u mozgu

Antioksidativni efekat oksima K027 i K203 pokazan je na nivou $O_2^{\cdot -}$, TAS i OSI i bio je dozno zavistan (Slika 70a, 71a i 72), a oksim K027 pokazao je i dozno zavisno smanjenje MDA, dok je oksim K203 jedino u dozi od 5% $LD_{50}=35 \mu\text{mol/kg}$ značajno smanjio nivoe MDA u odnosu na DDVP-grupu (Slika 73).

K-oksimi nisu ostvarili značajan efekat na nivoe TOS u mozgu pacova, značajno povišene usled dejstva DDVP-a, a jedino je oksim K203 u dozi od 5% $LD_{50}=35 \mu\text{mol/kg}$ značajno smanjio ovaj biomarker u mozgu životinja (Slika 70b). Takođe, K-oksimi nisu ostvarili značajan efekat na nivoe ukupnih -SH grupa i AOPP u mozgu, čije značajne promene u odnosu na netretirane životinje nije izazvao ni DDVP (Slika 71b i 73c).

Dozna zavisnost antioksidativnih efekata K-oksima u mozgu bila je opisana petoparametarskim modelima sa parametrom b značajno različitim među krivama koje pripadaju oksimu K027 i K203 (Tabela 25).

Najveći i gotovo jednaki kapacitet oksimi su ostvarili za povećanje TAS i smanjenje OSI (oko 6-puta), zatim za smanjenje $O_2^{\cdot -}$ (4,2-puta) i najmanji za efekat smanjenja MDA (2,2-puta) u mozgu (Tabela 25).

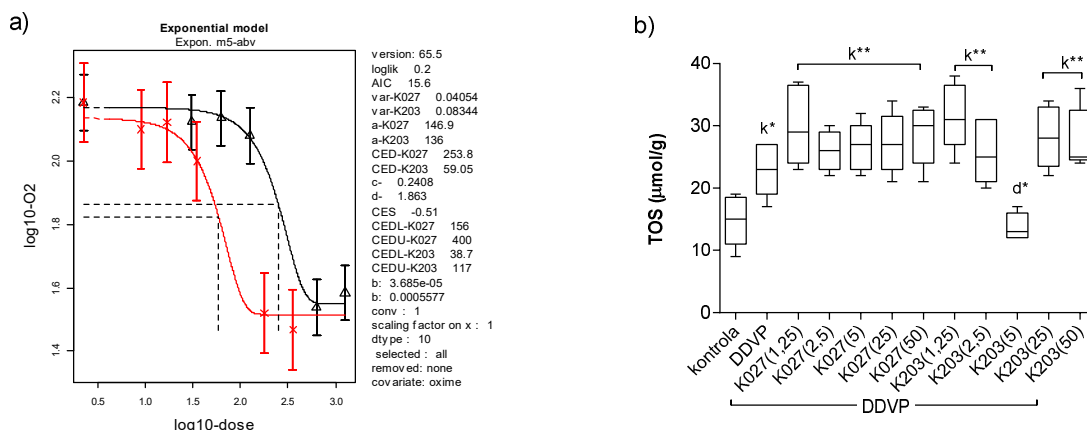
Dobijeno je da su promene porasta TAS, smanjenja OSI i smanjenja MDA u funkciji doze oksima jednaki ($d=4$) i dva puta veći od smanjenja $O_2^{\cdot -}$ ($d=1,863$) (Tabela 25).

Najniže doze kritičnog efekta K-oksima su dobijene za efekte povećanja TAS ($CE_{D145}\text{-K027}=86 \mu\text{mol/kg}$, $CE_{D145}\text{-K203}=32 \mu\text{mol/kg}$) i smanjenja OSI ($CE_{D59}\text{-K027}=80 \mu\text{mol/kg}$, $CE_{D59}\text{-K203}=21 \mu\text{mol/kg}$); zatim za efekat smanjenja MDA ($CE_{D33}\text{-K027}=92 \mu\text{mol/kg}$); dok su više doze bile potrebne za kritične efekte smanjenja $O_2^{\cdot -}$ u mozgu ($CE_{D51}\text{-K027}=254 \mu\text{mol/kg}$, $CE_{D51}\text{-K203}=59 \mu\text{mol/kg}$) (Tabela 26).

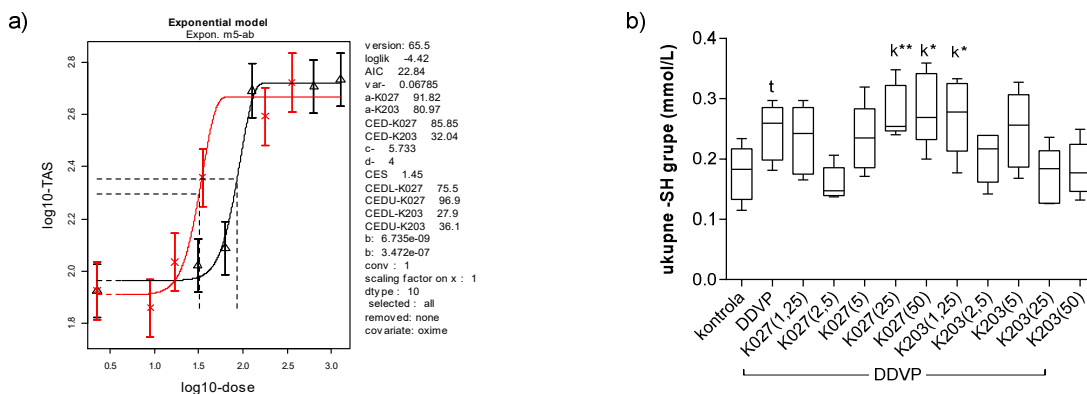
Preciznost procenjenih CED je bila bolja za biomarkere TAS, OSI i MDA u odnosu na $O_2^{\cdot -}$ (Tabela 26).

Na osnovu vrednosti RPF uočava se veća potentnost oksima K203 u odnosu na oksim K027 u ispoljavanju antioksidativnih efekata na nivou mozga, pri čemu je

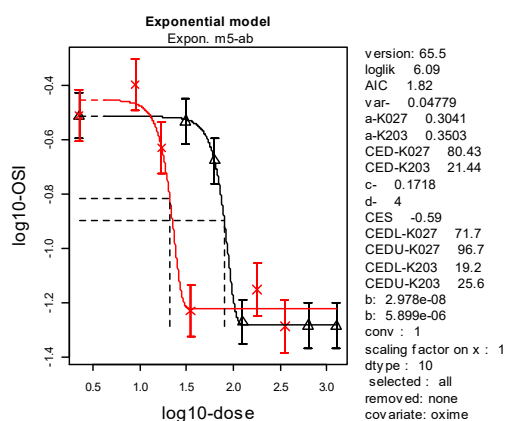
ta razlika najveća na nivou smanjenja $O_2^{\cdot -}$ ($RPF_{K203}=5,261$, značajna za jak i umeren efekat), zatim smanjenja OSI ($RPF_{K203}=3,353$, značajna za sve intenzitete efekta), a najmanja na nivou povećanja TAS ($RPF_{K203}=2,467$, za sve intenzitete efekta) (Tabela 26).



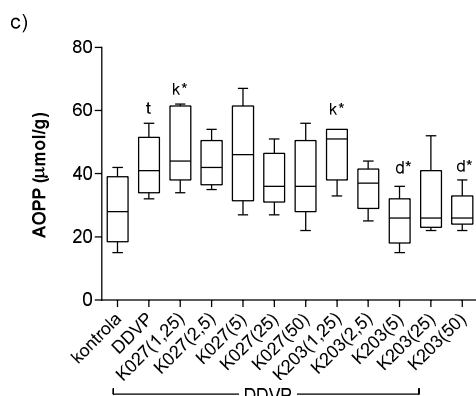
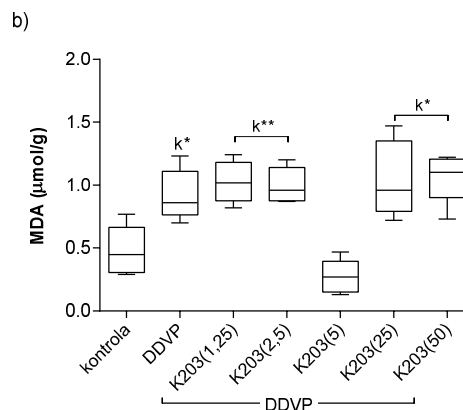
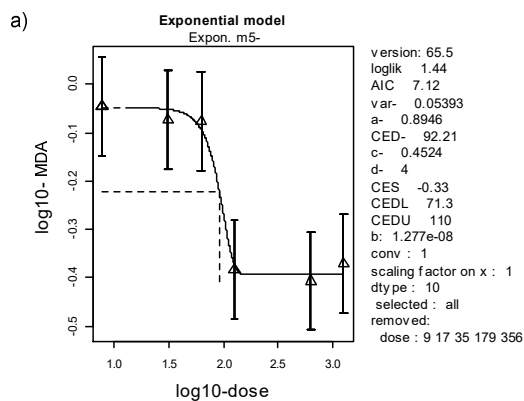
Slika 70. Prooksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027: a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot -}$) za oksim K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva) i b) totalni oksidativni status (TOS), značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 71. Antioksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027: a) totalni antioksidativni status (TAS) za oksim K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva) i b) ukupne -SH grupe, značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 72. Indeks oksidativnog stresa (OSI) u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva).



Slika 73. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027: a) malondialdehid (MDA) za oksim K027, b) malondialdehid (MDA) za oksim K203 i c) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).

Tabela 25. Parametri modela dozne zavisnosti efekata oksima K203 i K027 na biomarkere redoks statusa u mozgu pacova

Biomarker	AIC _{full}	AIC _{min}	D-E trend	Model	Oksim	Parametri modela					M			CES (%)		
						var	a	b	c	d	n-puta	Jak	Umeren	Slab		
O₂^{-•}	25,38	15,60	da ↓	E5-abv	K027	0,04054	147	5,58E-04	0,2408	1,863	4,153	0,2	-76	-51	-30	-16
					K203	0,08344	136	3,69E-05								
TAS	24,38	22,84	da ↑	E5-ab	K027	0,06785	91,82	3,47E-07	5,733	4,000	/	6,0	500	145	57	25
					K203		80,97	6,74E-06								
OSI	3,12	1,82	da ↓	E5-ab	K027	0,04779	0,3041	5,90E-03	0,1718	4,000	5,821	0,2	-83	-59	-36	-20
					K203		0,3503	2,98E-05								
MDA	12,28	7,12	da ↓	E5	K027	0,05393	0,8946	1,28E-08	0,4524	4,000	2,210	0,5	-55	-33	-18	-9

D-E trend, doza-efekat trend; ↓ smanjenje, ↑ povećanje; M-maksimalna veličina efekta; CES-engl. *critical effect size*, veličina kritičnog efekta.

Tabela 26. Doze kritičnih efekata oksima (engl. *critical effect dose*, CED) K203 i K027 na biomarkere redoks statusa u mozgu pacova, mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) i relativni faktor potentnosti (RPF)

Biomarker	Oksim	CED ($\mu\text{mol/kg}$)									CEDU/CEDL odnos			RPF _{K203}
		Jak			Umeren			Slab			Jak	Umeren	Slab	
		CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU				
O₂^{•-}	K027	254	156	400	166	106	306	111	57	240	2,6	2,9	4,2	5,261
	K203	59	39	117	39	25	83	26	14	61	3,0	3,3	4,4	
TAS	K027	86	79	97	66	56	74	53	42	60	1,2	1,3	1,4	2,467
	K203	32	28	36	25	20	28	20	16	22	1,3	1,4	1,4	
OSI	K027	80	72	97	66	59	79	55	46	66	1,3	1,3	1,4	3,353
	K203	21	19	26	17	16	21	15	12	17	1,4	1,3	1,4	
MDA	K027	92	71	110	75	54	89	61	39	73	1,5	1,6	1,9	

Antioksidativni i dozno zavisni efekti oksima K027 i K203 datih sa atropinom su pokazani smanjem $O_2^{\cdot -}$ i povećanjem TAS u mozgu pacova (Slika 74a i 75a). Dodatno, oksim K027 dat sa atropinom je dozno zavisno smanjio nivoe MDA, značajno povišene u mozgu pacova usled dejstva DDVP-a (Slika 77a).

Međutim, dozna zavisnost nije pokazana za efekat K-oksima uz atropin na TOS u mozgu, pri čemu su oba oksima pri nižim dozama značajno smanjili TOS na kontrolni nivo (oksim K027 31-126 $\mu\text{mol/kg}$, oksim K203 9-35 $\mu\text{mol/kg}$), ali su pri višim dozama doveli do povećanja TOS na nivo DDVP-grupe (Slika 74b). Isti trend pokazala je kombinacija oksima K203 i atropina za efekat na MDA u mozgu DDVP-u izložene grupe životinja (Slika 77b).

Indeks oksidativnog stresa, povišen u mozgu pacova trovanih DDVP-om, bio je značajno smanjen tek pri višim ispitivanim dozama K-oksima (25% i 50% LD_{50}) i tada je bio na nivou kontrolne grupe (Slika 76).

Kombinacije K-oksima sa atropinom nisu značajno uticale na nivoe ukupnih -SH grupa i AOPP u mozgu, čije promene u odnosu na netretirane životinje nije izazvao ni DDVP, kao ni terapija samo atropinom (Slika 75 b i 77c).

Dozno zavisno povećanje TAS i smanjenje MDA bilo je opisano petoparametarskim modelima, dok je smanjenje $O_2^{\cdot -}$ opisivao troparametraski model sa značajnom razlikom u parametru b krivih koje pripadaju različitim oksimima (Tabela 27).

Najveći kapacitet K-oksima dati sa atropinom su ostvarili za efekat povećanja TAS u mozgu (6-puta), pri čemu je ovaj efekat pokazao i najveću promenu u funkciji doze ($d=3,124$) (Tabela 27). Niže maksimalne efekte, ali značajno niže promene efekata u funkciji doze, imale su krive smanjenja $O_2^{\cdot -}$ (4-puta, $d=0,25$) i kriva smanjena MDA u mozgu primenom oksima K027 i atropina (3,6-puta i $d=0,6$). Niže doze K-oksima date sa atropinom dovele su do smanjenja $O_2^{\cdot -}$ (CE_{50} -K027=53 $\mu\text{mol/kg}$, CE_{50} -K203=30 $\mu\text{mol/kg}$), kao i smanjenja MDA oksimom K027 (CE_{145} -K027=45 $\mu\text{mol/kg}$) u odnosu na doze oksima koje su bile neophodne za povećanje TAS (CE_{145} -K027=232 $\mu\text{mol/kg}$, CE_{145} -K203=76 $\mu\text{mol/kg}$) (Tabela 28).

Veća preciznost procenjenih CED je dobijena za efekat na TAS, zatim na $O_2^{\cdot -}$, a najmanja za efekat oksima K027 i atropina na MDA u mozgu (Tabela 28).

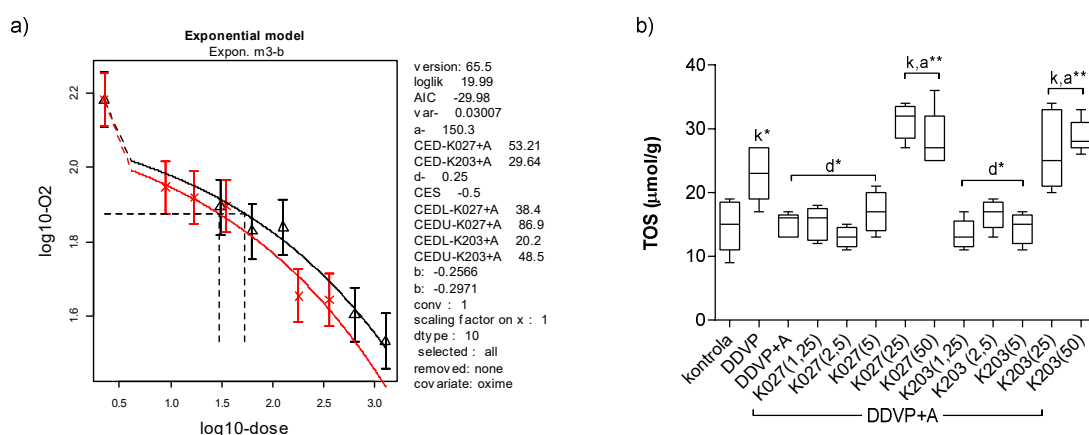
Na osnovu vrednosti RPF uočava se značajno veća potentnost oksima K203 u odnosu na oksim K027 u ispoljavanju efekata povećanja TAS ($RPF_{K203}=3,023$) (Tabela 28).

U pogledu maksimalnih efekata oksima, uključivanje atropina jedino je povećalo efekat oksima K027 na smanjenje MDA (sa 2,2 na 3,6 puta), dok na maksimalne veličine ostalih efekata nije imao značajnog uticaja (Tabela 25 i 27). Sa druge strane, uključivanje atropina dovelo je do značajnog smanjenja promene veličine efekata u funkciji doze za sve antioksidativne efekte K-oksima (Tabela 25 i 27).

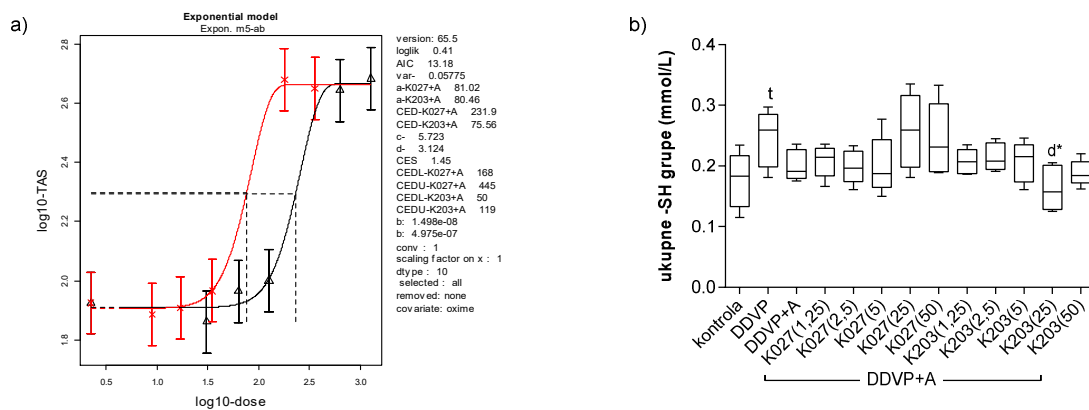
Uključivanje atropina u antidotsku terapiju, dovelo je do značajne redukcije doza oksima K027 oko 5 puta, a oksima K203 dva puta za efekat smanjenja $O_2^{\cdot-}$, kao i do izjedančavanja potentnosti dva oksima za ovaj efekat na osnovu smanjenja RPF_{K203} (za jak efekat, Tabela 26 i 28).

Dodatno, uključivanje atropina u terapiju dovelo je do redukcije doza oksima K027 dva puta za smanjenje MDA (Tabela 26 i 28).

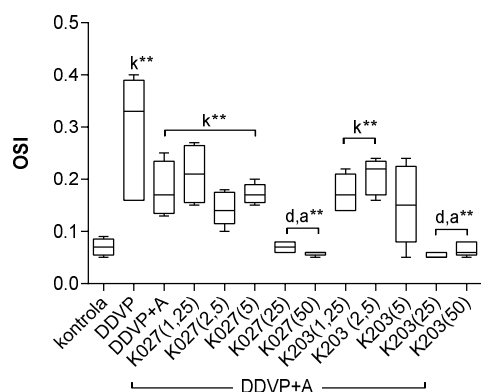
Međutim, za efekat povećanja TAS u mozgu, pridruživanje atropina oksimima u terapiju, dovelo je do povećanja doza kritičnog efekta 2,7 puta za oksim K027 i 2,4 puta za oksim K203 i povećanja razlike u potentnosti dva oksima (za jak efekat, Tabela 26 i 28).



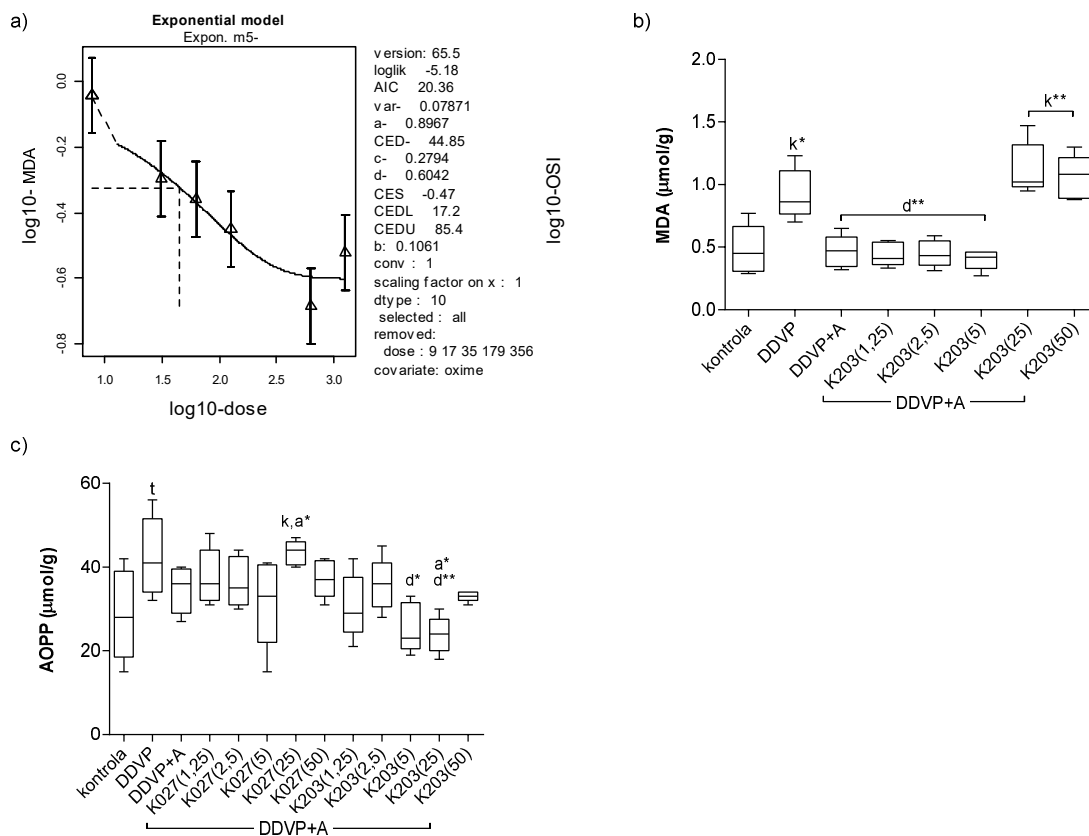
Slika 74. Prooksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A): a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) za oksim K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva) i b) totalni oksidativni status (TOS), značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 75. Antioksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om funkciji doze oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A): a) totalni antioksidativni status (TAS) za oksim K203 (krstići, crvena kriva) i K027 (trouglovi, crna kriva) i b) ukupne -SH grupe, značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 76. Indeks oksidativnog stresa (OSI) u mozgu i mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 (krstići, crvena kriva) i K027 primenjenih sa atropinom (A). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).



Slika 77. Biomarkeri oksidativnog oštećenja makromolekula u mozgu mužjaka *Wistar* pacova trovanih DDVP-om u funkciji doze oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A): a) malondialdehid (MDA) za oksim K027, b) malondialdehid (MDA) za oksim K203 i c) uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP). Značajno različito k vs. kontrola, d vs. DDVP, a vs. DDVP+A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U).

Tabela 27. Parametri modela dozne zavisnosti efekata oksima K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A) na biomarkere redoks statusa u mozgu pacova

Biomarker	AIC _{full}	AIC _{min}	D-E trend	Model	Oksim	Parametri modela					M			CES (%)		
						var	a	b	c	d	M=1/c	n-puta M=c	%	Jak	Umeren	Slab
O ₂ ^{••} <i>a</i> =DDVP	-21,48	-28,50	da ↓	E3-b	K027+A	0,03007	150,3	-2,97E-01	/	0,250	4,000	0,3	-75	-50	-29	-16
					K203+A			-2,57E-01								
TAS <i>a</i> =DDVP	22,08	13,18	da ↑	E5-ab	K027+A	0,05775	81,02	4,98E-07	5,723	3,124	/	6,0	500	145	57	25
					K203+A			80,46	1,50E-08							
MDA <i>a</i> =DDVP	20,84	20,36	da ↓	E5	K027+A	0,07871	0,8967	0,1016	0,2794	0,604	3,579	0,3	-72	-47	-27	-15
					/			/								

D-E trend, doza-efekat trend; ↓ smanjenje, ↑ povećanje; M-maksimalna veličina efekta; CES-engl. *critical effect size*, veličina kritičnog efekta.

Tabela 28. Doze kritičnih efekata oksima (engl. *critical effect dose*, CED) K203 i K027 primenjenih sa atropinom (A) na biomarkere redoks statusa u mozgu pacova, mera njihove preciznosti (odnos CEDU/CEDL) i relativni faktor potentnosti (RPF)

Biomarker	Oksim	CED (μmol/kg)									CEDU/CEDL ratio			RPF _{K203}
		Jak			Umeren			Slab			Jak	Umeren	Slab	
		CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU	CED	CEDL	CEDU				
O ₂ ^{••} <i>a</i> =DDVP	K027+A	53	38	87	3	2	7	0	0	1	2,3	3,5	4,2	1,688
	K203+A	30	20	49	2	1	4	0	0	0	2,5	4,0	4,3	
TAS <i>a</i> =DDVP	K027+A	232	168	445	166	127	342	126	91	274	2,6	2,7	3,0	3,023
	K203+A	76	50	119	54	39	91	41	27	74	2,4	2,3	2,7	
MDA <i>a</i> =DDVP	K027+A	45	17	85	12	2	31	4	0	15	5,0	20,7	100,0	/
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	

5. DISKUSIJA

Eksperimentalne i kliničke studije pokazale su nezadovoljavajuću i/ili nejednaku antidotsku efikasnost postojećih oksima kod trovanja strukturno različitim OF (Antonijević i Stojiljković, 2007; Worek i sar., 2016). Stoga istraživači ulažu značajne napore u sintetisanje i ispitivanje novih oksimskih struktura, kao potencijalnih antidota kod trovanja OF, sa ciljem pronalaženja jedinjenja sa boljim antidotskim karakteristikama i/ili širim spektrom dejstva u odnosu na postojeće oksime (Musilek i sar., 2011a; Korabecny i sar., 2014). Stoga su u ovoj studiji, na eksperimentalnom modelu, bili ispitani antidotski efekti bispiridinijumskih oksima K203 i K027, koji su u poslednjoj dekadi istraživanja dali obećavajuće rezultate. U skladu sa ciljem ispitivanja *in vivo* terapijskih, reaktivatorskih i antioksidativnih efekata K-oksima, DDVP je odabran kao model organofosfornih pesticida, koji do sada nije ispitan i koji, na osnovu postojećih eksperimentalnih nalaza, poseduje visoku akutnu toksičnost, direktno inhibira holinesteraze usled prisustva okson strukture, i izaziva oksidativni stres *in vivo* (Cankayali i sar., 2005; Hasan i Ali, 1981; Masoud i sar., 2009).

Terapijska, reaktivatorska i antioksidativna efikasnost oksima K027 i K203 je bila upoređena sa efikasnošću četiri oksima – obidoksim, trimedoksim, pralidoksim i azoksim – koji su do sada našli primenu u lečenju akutnih trovanja ljudi organofosfatima (sa izuzetkom trimedoksima) i tipično se koriste u eksperimentalnoj praksi (Balali-Mood i Shariat, 1998; Bentur i sar., 2006; Kusic i sar., 1991; Thiermann i sar., 1997; Willems i sar., 1993).

5.1. Terapijska i reaktivatorska efikasnost oksima

Oksimi K203 i K027 su primarno sintetisani i testirani protiv OF nervnih agenasa (Kuča i sar., 2003a; 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; Musilek i sar., 2008a), 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., 2008c; 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). Podaci o *in vivo* terapijskoj i reaktivatorskoj efikasnosti oksima K203 i K027 kod trovanja različitim OF su sumirani u Tabelama 29 i 30, redom.

Tabela 29. *In vivo* terapijska efikasnost oksima K203 i K027 u poređenju sa četiri standardna oksima pri trovanju različitim OF

Vrsta	OF	Put OF	Doza oksima	Put oksima	Doza atropina (mg/kg)	Režim antidotskog tretmana	Redosled efikasnosti	Referenca
miš	tabun	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 1 min posle OF	K203, trimedoksim, obidoksim > azoksim	(Kassa i sar., 2008a)
miš	tabun	s.c.	25% LD ₅₀	i.p.	10	oksim 1 min posle OF	K203 ≈ trimedoksim	(Kovarik i sar., 2009)
miš	soman	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 1 min posle OF	azoksim > K203 ≈ trimedoksim ≈ obidoksim	(Kassa i sar., 2009a)
miš	ciklosarin	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 1 min posle OF	azoksim > K203 ≈ obidoksim	(Kassa i sar., 2009b)
miš	sarin	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 1 min posle OF	azoksim > K203 ≈ trimedoksim ≈ obidoksim	(Kassa i sar., 2011)
miš	tabun	s.c.	2% LD ₅₀	i.m.	8,4	oksim 1 min posle OF	K027 ≈ trimedoksim ≈ azoksim > obidoksim ≈ pralidoksim	(Kassa, 2006)
miš	tabun	s.c.	25% LD ₅₀	i.p.	10	odmah posle OF	K027 ≈ trimedoksim	(Berend i sar., 2008)
miš	soman	s.c.	25% LD ₅₀	i.p.	10	odmah posle OF	azoksim > K027	(Berend i sar., 2008)
pacov	POX	i.p.	50 μmol/jedinki	i.p.	/	oksim 1 min posle OF	K027 > pralidoksim	(Petroianu i sar., 2006b)
pacov	metil-POX	i.p.	50 μmol/jedinki	i.p.	/	oksim 1 min posle OF	K027 > trimedoksim ≈ pralidoksim ≈ obidoksim ≈ azoksim	(Petroianu i sar., 2007b)
pacov	DFP	i.p.	50 μmol/jedinki	i.p.	/	oksim 1 min posle OF	K027 ≈ obidoksim > pralidoksim	(Lorke i sar., 2008c)

POX-paraokson; DFP- diizopropilfluorofosfat

Tabela 30. *In vivo* reaktivatorska efikasnost oksima K203 i K027 u poređenju sa četiri standardna oksima pri trovanju različitim OF

Vrsta	OF	Doza OF (µg/kg)	Put OF	Doza oksima	Put oksima	Doza atropina (mg/kg)	Režim antidotskog tretmana	Izvor AChE	Redosled efikasnosti	Referenca
pacov	tabun	LD ₅₀ = 200	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 5 min pre OF	k, d	K203 ≈ trimedoksim ≈ obidoksim > azoksim	(Kassa i sar., 2008a)
pacov	tabun	LD ₅₀ = 200	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 5 min pre OF	m	K203 > trimedoksim, obidoksim, azoksim	(Kassa i sar., 2008a)
pacov	soman	LD ₅₀ = 80	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 1 min posle OF	k, d	d: azoksim > K203 ≈ trimedoksim ≈ obidoksim	(Kassa i sar., 2009a)
pacov	soman	LD ₅₀ = 74	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 5 min pre OF	k, d, m	b+d: azoksim > K203 ≈ trimedoksim ≈ obidoksim	(Kassa i sar., 2013a)
pacov	ciklosarin	LD ₅₀ = 150	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 5 min pre OF	k, d, m	azoksim > K203 ≈ obidoksim	(Kassa i sar., 2009b)
pacov	sarin	LD ₅₀ = 90	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 5 min pre OF	k, d, m	azoksim > K203 ≈ trimedoksim ≈ obidoksim	(Kassa i sar., 2011)
pacov	VX	LD ₅₀ = 13,9	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 5 min pre OF	k	azoksim > obidoksim > K203 ≈ trimedoksim	(Kassa i sar., 2013b)
pacov	VX	LD ₅₀ = 13,9	i.m.	5% LD ₅₀	i.m.	21	oksim 5 min pre OF	d	azoksim > obidoksim ≈ K203 ≈ trimedoksim	(Kassa i sar., 2013b)
pacov	POX	1 (75% LD ₅₀), 2, 3, 5 µmol/ jedinki	i.p.	50 µmol/ jedinki	i.p.	/	oksim 1 min posle OF	k	K027 > pralidoksim	(Petroianu i sar., 2006b)

POX-paraokson; k-krv, d-dijafragma, m-mozak.

Naša *in vivo* studija pokazala je superiornost oksima K027, datog samostalno, u smanjenju DDVP-om indukovano mortaliteta u poređenju sa svim ostalim ispitivanim oksimima. Očekivano, uključivanje atropina u terapiju, dovelo je do većeg preživljavanja životinja za sve ispitivane oksime, s obzirom na komplementarno antimuskarinsko dejstvo. Međutim, najveće i približno jednake vrednosti terapijskih indeksa dobijene su za kombinacije oksima K027 i obidoksima sa atropinom (TI=37,4 vs. 39,6). Štaviše, doprinos atropina terapijskom efektu bio je najmanji za oksim K027 (najmanja vrednost količnika terapijskog indeksa oksima K027 datog sa atropinom i samostalno).

Povoljan terapijski efekat oksima K027, datog samostalno ili u kombinaciji sa atropinom, izgleda da 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 pestidima (Thiermann i sar., 2005a, 2009), dok *in vitro* aktivnost AChE u hemidijafragmi 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 se najmanji nivo aktivnosti AChE u pontomedularnoj regiji, koji je neophodan za preživljavanje miševa trovanih nervnim agensom, kreće u opsegu 5-20% (Bajgar, 1991; Bajgar i sar., 1975, 1972, 1971).

Reaktivatorska sposobnost obidoksima, uprkos generalno dobrom terapijskom efektu, iznosila je 12, 14 i 5%, za AChE eritrocita, dijafragme i mozga, redom. Niska reaktivacija DDVP-om inhibirane AChE eritrocita ljudi (0-0,6%

aktivnosti kontrole) i homogenata mozga pacova (0–10% aktivnosti kontrole) dobijena je i *in vitro* pri koncentracijama obidoksima do 10^{-4} M (Atanasov i sar., 2013; Jun i sar., 2011). Međutim, ukupan terapijski efekat obidoksima može biti delimično objašnjen njegovim direktnim antiholinergičkim efektima, kao što je pokazano *in vitro* (na osnovu IC_{50} vrednosti u oksotremorinom-indukovanoj aktivaciji M_2 receptora u testu receptora spregnutih sa G proteinom, i sposobnosti da istisne muskarinski ligand [3H]-QNB sa vezujućeg mesta na receptoru) i *in vivo* (na osnovu smanjenja amplitude trzaja mišića kod pacova) (Soukup i sar., 2011b, 2011a). U navedenim studijama pokazan je niži antimuskarinski i antinikotinski potencijal oksima K027 u poređenju sa obidoksimom, što zajedno sa našim rezultatima ide u prilog njegovom reaktivatorskom potencijalu.

Razlike u reaktivatorskoj efikasnosti oksima prema različitim OF jedinjenjima dovode se u vezu sa njihovom strukturom. Musilek i sar. (2011a) su identifikovali nekoliko strukturnih faktora, koji utiču na reaktivatorsku potentnost oksima prema OF pesticidima. Oksimska grupa se smatra esencijalnom za aktivnost reaktivatora, sa položajem 4 na piridinijskom prstenu povoljnijim u odnosu na položaj 2, dok broj oksimskih grupa ne utiče na reaktivaciju i obično povećava toksičnost. Pokazano je da su biskvaternerna jedinjenja bolji reaktivatori od monokvaternernih jedinjenja (Musilek i sar., 2008b). Pokazano je takođe da je most sa 3-5 jednostrukih C–C veza koje povezuju dva piridinijska prstena relevantan za reaktivaciju, dok istovremeno ne utiče na *in vivo* toksičnost (Kuča i sar., 2003a, 2003b; Petroianu i sar., 2006b). U pogledu ne-oksimskog dela molekule, 3- ili 4-karbamoil, metilkarbonil ili izohinolinijum grupe povećavaju reaktivatorsku sposobnost i smanjuju toksičnost oksima (Kuča i sar., 2003a, 2003b; Musilek i sar., 2007a, 2007b; Musilek i sar., 2008a).

Sve ove strukturne karakteristike su prisutne u strukturi oksima K027 (Tabela 1) što može biti, barem delimično, objašnjenje za njegov dobar reaktivatorski potencijal. Oksim K027 je nastao kombinacijom struktura azoksima, kao oksima sa najširim spektrom dejstva, sa izuzetkom tabuna, ali malom stabilnošću zbog prisustva oksapropanskog mosta, i trimedoksima, kao stabilne oksimske strukture efikasne kod tabuna (Kuča i sar., 2003a). Jedina strukturna

razlika oksima K027 od trimedoksima jeste karbamoil funkcionalna grupa umesto oksimske u strukturi trimedoksima. Iako i oksimska i karbamoil grupa mogu formirati za reaktivaciju važne vodonične veze sa reziduama amino kiselina u aktivnom centru enzima (Musilek i sar., 2011b), u našoj studiji mogući doprinos karbamoil funkcionalne grupe je generalno bolja reaktivacija AChE inhibirane DDVP-om i istovremeno oko pet puta manja akutna toksičnost oksima K027 u odnosu na trimedoksim.

Prisustvo dvostruke veze i jednog ugljenikovog atoma više u ugljovodoničnom mostu između piridinijumskih prstenova u strukturu oksima K203 u poređenju sa K027, rezultiralo je manjim reaktivatorskim potencijalom prema DDVP-inhibiranoj AChE i istovremeno većom akutnom toksičnošću. Iako je uvođenje dvostruke veze u strukturi oksima K203 imalo za cilj da omogući potencijalne π - π interakcije sa aktivnim mestom enzima (Musilek i sar., 2007b; Musilek i sar., 2010), moguće je da je ovim prostorna orijentacija piridinijumskih prstenova ograničena s obzirom na to da dvostruka veza čini molekul rigidnijim i menja konformaciju molekule. Ipak, studije molekularnog dokinga pokazale su povoljniju prostornu konformaciju oksima K203 u aktivnom centru AChE miša inhibirane tabunom, a njegova bolja *in vitro* reaktivatorska potentnost od obidoksima kod tabuna se objašnjava jačim π - π interakcijama usled prisustva dvostruke veze sa aromatičnim reziduama i uspostavljanjem dodatnih vodoničnih veza karbamoil funkcionalne grupe oksima K203 (Musilek i sar., 2010).

Pored dobrog reaktivatorskog potencijala oksima K027, rezultati naše studije pokazuju da, pri *i.m.* primeni, oksim K027 poseduje najmanju akutnu toksičnost među ispitivanim oksimima na mužjacima *Wistar* pacova, a njegova srednja letalna doza je veća oko 1,4 puta od iste doze azoksima, koji se smatra najmanje toksičnim standardnim oksimom za sisare (Eyer i Worek, 2007). Akutna *i.m.* toksičnost oksima K203 je niža od toksičnosti trimedoksima i obidoksima, ali istovremeno viša od toksičnosti oksima K027, pralidoksima i azoksima. Naši 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., 2008c; 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 našoj 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). Kada je u pitanju statistička analiza, uočava se binarni sistem evaluacije, koji omogućava kvalitativnu diferencijaciju reaktivatora koji su sposobni da daju indikativan pozitivan odgovor. Tačnije, u *in vitro* eksperimentima oksimi su ispitivani u najčešće dve ili tri koncentracije (retko više) i upoređivani sa kontrolom (Arshad i sar., 2018; Jun i sar., 2010; Kuca i sar., 2010; Lorke i sar., 2008a; Musilek i sar., 2007a, 2007b; Musilek i sar., 2010, 2008a; Musilova i sar., 2009; Petroianu i sar., 2007a, 2006a); u *in vivo* eksperimentima ispituju se efekti jedne ili dve doze oksima u odnosu na kontrolu (Berend i sar., 2012; Kassa i sar., 2008b; Kovarik i sar., 2009; Petroianu i sar., 2006b, 2007b) i konačno, postojeći rezultati randomizovanih kliničkih studija dozvolili su poređenja efekata jedne doze pralidoksima u odnosu na *placebo* ili efekata „više“ u odnosu na „nižu“ dozu (Buckley i sar., 2011). Dalje, sagledavanjem protokola *in vivo* eksperimentata uočava se ispitivanje oksima u ekvitoksičnim dozama, sa ciljem procene uticaja njihove toksičnosti na bezbednost primene (Tabela 29 i Tabela 30). Međutim, poređenje bezbednosti primene oksima,

što je jednako važno kao i poređenje njihove terapijske efikasnosti, postaje relevantno tek pri poređenju ekviefektivnih doza oksima.

Stoga je u našoj studiji kvantitativno evaluirana *in vivo* efikasnost eksperimentalnih oksima K203 i K027 sa ciljem modelovanja dozne zavisnosti efekata, kvantifikovanja veličina efekata i ekviefektivnih doza i konačno, poređenja njihove antidotske efikasnosti.

U tom cilju primenili smo *Benchmark* metodologiju, kao naprednu statističku metodologiju za analizu odnosa doze i efekta u toksikološkim istraživanjima (Slob, 2002b), po prvi put, prema našim najboljim saznanjima u evaluaciji oksimskih reaktivatora. Međutim, BMD pristup se široko koristi za evaluaciju toksičnosti OF pesticida u cilju procene rizika po zdravlje ljudi za specifičan efekat inhibicije AChE (EFSA, 2017, 2009; Slob, 2002b; US EPA, 2006). Nedavno je pokazano da kombinovani BMD pristup sa kovarijansom, korišćen u našim analizama, povećava preciznost procenjivanja pojedinačnih BMD s obzirom da svi setovi podataka doza-efekat, uključeni u analizu, doprinose procenjivanju (Slob i Setzer, 2014; Wills i sar., 2016a, 2016b). Analiza literaturno dostupnih podataka (Slob i Setzer, 2014) pokazala je da veliki broj toksikoloških efekata (i *in vitro* i *in vivo*), uključujući aktivnost AChE, može biti adekvatno opisana 4-parametarskim eksponencijalnim i/ili *Hill*-ovim modelom. Takođe, BMD pristup predstavlja značajan korak napred u ogleđima na životinjama iz prespektive principa 3R (engl. *Replacement*-zamena, *Reduction*-smanjenje broja i *Refinement*-usavršavanje metoda), naročito za smanjenje broja potrebnih životinja, s obzirom na to da svaka jedinka korišćena u eksperimentu doprinosi izračunavanju BMD (Slob, 2014b, 2014a). Kvantitativna evaluacija oksima *Benchmark* metodologijom poboljšava identifikaciju i kvantifikaciju i doze i efekta i omogućava robustnije poređenje efikasnosti među različitim reaktivatorima.

Nasuprot do sada objavljenim *in vivo* eksperimentalnim protokolima, koji su ispitivali jednu ili ređe dve doze, ispitivali smo efekte šest različitih doza oksima K203 i K027, a dizajn naše studije je bio zasnovan na sledećem: 1) pokazano je da optimalni dizajn eksperimenta za određivanje BMD kontinuiranih efekata sa velikim koeficijentom varijacije ($\geq 18\%$) čini šest doznih grupa (Slob i sar., 2005); 2) analiza

32 *in vivo* studije pokazala je varijaciju od 18,6% za inhibiciju AChE OF (Slob, 2017; Slob i Setzer, 2014).

Analiza odnosa doza-odgovor pokazala je rastući trend aktivnosti AChE, u sva tri ispitivana tkiva, sa porastom doze oba eksperimentalna oksima, K203 i K027, kod pacova trovanih DDVP-om. Međutim, oksim K027 dat u najvišoj ispitivanoj dozi, 50% LD₅₀, je doveo do značajnog pada aktivnosti AChE, što je uticalo da model ne zadovolji kriterijum dozno zavisnog trenda. Ovaj efekat doze 50% LD₅₀ pokazao je visoku konzistentnost unutar studije na nivou sva tri ispitivana tkiva za oksim K027, dok je za oksim K203 isti efekat najviše ispitivane doze dobijen samo na nivou moždanog tkiva. Ovde je važno imati u vidu da modeli u modelovanju odnosa doza-efekat ne odražavaju nijedan biološki mehanizam, kao i da različiti biološki mehanizmi mogu igrati ulogu pri visokim dozama jedinjenja u poređenju sa niskim (Slob, 2002b; Slob i sar., 2005). U tom pogledu, pri visokim dozama oksima, može se očekivati njihov ranije pokazan afinitet prema intaktnoj AChE, što je jedan od ograničavajućih faktora za maksimalno terapijsko doziranje (Lorke i sar., 2008a; Voicu i sar., 2013; Worek i sar., 2016). Dalje, tokom kompleksnog procesa reaktivacije AChE, dolazi do formiranja fosforilisanog oksima, koji u zavisnosti od stabilnosti, može direktno reinhibirati prethodno reaktiviran enzim (Luo i sar., 1999; Milatović i Jokanović, 2009; Radchenko i sar., 2008; Worek i sar., 2007). Štaviše, pokazano je da su dimetilfosforil oksimi, čije formiranje može biti očekivano u našoj studiji usled korišćenja dimetil-OF modela (DDVP-a), potentniji reinhibitori AChE u poređenju sa dietilfosforil oksimima (Kiderlen i sar., 2000; Worek i sar., 2000). Takođe, uočena je oštećena ekskretorna funkcija jetre pacova nakon *i.m.* davanja oksima K027 upravo pri dozi 50% LD₅₀ (Pejchal i sar., 2008), što može doprineti njegovoj hepatotoksičnosti, efektu koji je identifikovan kao jedan od toksičnih efekata nekih oksima (Balali-Mood i sar., 2006; Balali-Mood i Shariat, 1998; Marrs i Vale, 2006). Na osnovu prethodno navedenih metodoloških i bioloških premisa, modelovanje doza-odgovor je nastavljeno izuzimajući najvišu ispitivanu dozu oksima, jer smo pretpostavili da je smanjena aktivnost enzima posledica toksičnosti samog oksima.

Svrha modelovanja doza-odgovor je procenjivanje doze (doze kritičnog efekta, CED) koja dovodi do unapred definisane, biološki značajne veličine

odgovora/efekta (veličina kritičnog efekta, CES). Međutim, glavni praktični izazov koji se pojavio tokom analize aktivnosti AChE u funkciji doze oksima u našoj studiji, bio je definisanje vrednosti CES, koji treba da kvantifikuje veličinu reaktivacije enzima, biološki značajne iz perspektive antidotske terapije. Kao što je već pomenuto, *Benchmark* metodologija se koristi za aktivnost AChE kao kritičan efekat, ali kao rezultat procesa inhibicije od strane OF u cilju procene rizika po zdravlje ljudi, gde je prihvaćeno da veličina inhibicije od 20% nema značajne posledice po ljudsko zdravlje (EFSA, 2013, 2011). U našoj studiji, nivo aktivnosti AChE je posledica procesa reaktivacije oksimima nakon inhibicije modelom OF. Stoga, CES predstavlja promenu aktivnosti enzima izraženu u odnosu na nivo aktivnosti pri nultoj dozi ispitivanih oksima, tačnije aktivnosti enzima određene kod grupe životinja izložene samo DDVP-u, odnosno veličinu reaktivacije. Ovo je osnovna razlika u izražavanju veličine efekta u odnosu na tradicionalnu praksu *in vivo* ispitivanja efikasnosti oksima, gde se nivo aktivnosti AChE izražava kao % od aktivnosti određene kod kontrolne grupe životinja. Postoje izveštaji studija o biološki značajnim nivoima aktivnosti AChE u različitim tkivima, izraženo na tradicionalan način: aktivnost AChE eritrocita iznad 30% kontrolnog nivoa je bila povezana sa normalnom mišićnom funkcijom kod pacijenata trovanih OF pestidima (Thiermann i sar., 2005a); *in vitro* aktivnost AChE u hemidijafragmi miša 30-40% kontrolnog nivoa oporavlja mišićnu funkciju u prisustvu paraoksiona (Thiermann i sar., 2010); najmanji nivo aktivnosti AChE u pontomedularnoj regiji, koji je bio neophodan za preživljavanje miševa trovanih nervnim agensom procenjen je na 5-20% (Bajgar, 1991; Bajgar i sar., 1975, 1972, 1971). Međutim, do sada nije precizirana minimalna reaktivacija AChE u ciljnim tkivima koja garantuje preživljavanje.

Nedavno je, međutim, ustanovljena praktično primenljiva teorija o određivanju veličina intenziteta efekata, koja se zasniva na činjenici da se različiti biološki parametri razlikuju u ispoljavanju uticaja tretmana (Slob, 2017). Kao rezultat doza-odgovor analize za 27 različita *in vivo* efekta, uključujući aktivnost AChE, definisana je kvantitativna veza između maksimalne veličine efekta (M) i devijacije unutar grupe (s), sa metodom izračunavanja CES za tri nivoa intenziteta efekta, nazvanim jak, umeren i slab.

Maksimalna reaktivacija AChE K-oksima bila je značajno različita na nivou ispitivanih tkiva: najniža u mozgu, viša u dijafragmi i najviša u eritrocitima (1,5, 2,1 i 2,5-puta, redom). Niži maksimalni nivo reaktivacije AChE dobijen u dijafragmi i mozgu u poređenju sa eritrocitima može biti objašnjen, očekivano, nižom bioraspoloživošću oksima intracelularnoj frakciji AChE dijafragme i u mozgu s obzirom na njihovu nisku lipofilnost ($\log P = -3$ za oba K-oksima) i jonizaciju oksima pri fiziološkom pH (Kalász i sar., 2015; Musil i sar., 2016). Međutim, upravo je jonizovani oblik oksima odgovoran za njihove nukleofilne osobine i napad na aktivni centar inhibiranog enzima u procesu reaktivacije (Slika 2). U pogledu distribucije, niska plazma:mišić (~2% vs. 3,5%), kao i plazma:mozak (~1,3% vs. 1%) frakcija oksima K027 i K203 je nađena 20 minuta nakon *i.m.* davanja 1500 mg po jedinki eksperimentalnih prasadi (Karasova i sar., 2017). Sa druge strane, treba imati u vidu da je aktivnost AChE u našoj studiji merena u homogenatima dijafragme. Iako čini svega ~20% ukupne aktivnosti homogenata, aktivnost eksterne (površinske) AChE dijafragme se smatra i primarno funkcionalnom AChE neuromuskularne spojnice i upravo njena aktivnost korelira sa holinergičkim efektom grčenja inkatnog mišića dijafragme pacova *in vitro* (Mittag i sar., 1971). Naime, dijafragma pacova davala je normalne kontrakcije pri inhibiciji eksterne AChE manje od 35%, iako je interna AChE bila inhibirana 80-90%. Ispitivanja farmakokinetičkog profila K-oksima, pokazala su sličan profil promene koncentracije sa vremenom u plazmi i moždanom tkivu, s tim da su maksimalne koncentracije dostizane u mozgu 15-30 minuta kasnije u odnosu na plazmu (Kalasz i sar., 2013; Kalász i sar., 2008; Karasova i sar., 2013). Relativno visoke koncentracije oksima K027 i oksima K203 nađene su u mozgu pacova nakon *i.m.* primene terapijskih doza (5-35% LD₅₀), koje su bile stabilne do 60 minuta od injekcije, stoga određeni stepen reaktivacije AChE u mozgu nije mogao biti isključen (Kalasz i sar., 2013; Kalász i sar., 2008; Karasova i sar., 2013; Karasová i sar., 2014).

S obzirom na činjenicu da se tkiva razlikuju u izražavanju uticaja tretmana, *Slob*-ova teorija je omogućila određivanje ekvivalentnih intenziteta efekta između tri ispitivana tkiva u našoj studiji – eritrocita, dijafragme i mozga: CES_{jak} = 58%, 45% i 22%, redom, i posledično određivanje ekviefektivnih doza K-oksima ne samo na nivou jednog tkiva, već među različitim tkivima (Slob, 2017; Slob i Setzer, 2014).

Međutim, esencijalan rezultat doza-odgovor analize je interval pouzdanosti CED, koji predstavlja opseg doza u kome leži tačna vrednost CED. Nedavno je pokazano da poređenje intervala pouzdanosti CED, nasuprot poređenju pojedinačnih parametara (npr. CED, CEDL ili CEDU), predstavlja robustan način kvantitativnog poređenja jedinjenja (Bemis i sar., 2016; Soeteman-Hernández i sar., 2015; Wills i sar., 2017, 2016a, 2016b). Analiza intervala pouzdanosti CED oksima K027 i K203 u reaktivaciji AChE u našoj studiji pokazala je visoku konzistentnost rezultata koji su nesumnjivo pokazali veću potentnost oksima K027 na nivou sva tri tkiva (eritrocita/dijafragme/mozga za efekat jakog intenziteta: $CED_{\text{jak-K027}} = 52/18/90 \mu\text{mol/kg}$ vs. $CED_{\text{jak-K203}} = 100/100/179 \mu\text{mol/kg}$). Za efekte slabijeg intenziteta odnosno pri nižim doznim nivoima oksima veća potentnost oksima K027 nije mogla biti statistički podržana usled preklapanja intervala pouzdanosti ekvivalentnih CED dva K-oksima, iako su apsolutne vrednosti doza išle tome u prilog. Najveća prednost u reaktivatorskoj potentnosti oksima K027 u poređenju sa oksimom K203 dobijena je za reaktivaciju AChE dijafragme, dok je u ovom smislu njegoova prednost bila manja na nivou eritrocita i mozga (RPF = 5 vs. 2, redom).

Generalno gledano, iako oksimi K027 i K203 pokazuju sličnu kinetiku *i.m.* apsorpcije (C_{max} i t_{max}), što je pokazano na modelu pacova i prasadi (Karasova i sar., 2017; Zemek i sar., 2013), niže ekvivalentne doze oksima K027 u poređenju sa K203 dobijene u našoj studiji mogu biti delimično objašnjene njegovom oko tri puta nižom potentnošću za vezivanje za proteine, što je pokazano u studiji na humanom serumu (Zemek i sar., 2013), kao i oko dva puta nižom plazma:urin frakcijom i eliminacijom putem bubrega nađenoj na modelu prasadi (*i.m.*) (Karasova i sar., 2017). Ovakvi rezultati analize kinetike oksima K027 impliciraju njegovu veću farmakološki aktivnu koncentraciju *in vivo*.

Uloga AChE dijafragme je održavanje normalne neuromuskularne transmisije (NMT) i pokazano je *ex vivo* da smanjena mišićna sila korelira sa aktivnošću AChE u dijafragmi miša manjom od ~25% kontrolnih vrednosti u prisustvu paraoksona (Heffron i Hobbiger, 1979; Thiermann i sar., 2010, 2005b). Izražavanjem veličine reaktivacije od 45%, dobijene u našoj studiji za efekat jakog intenziteta, u skladu sa tradicionalnom praksom u odnosu na zdravu kontrolu, dobija se vrednost od 28% kontrolne aktivnosti enzima. S obzirom na to da je

dobijena vrednost aktivnosti AChE dijafragme od 28% veća od gorepomenutog kritičnog nivoa aktivnosti enzima, normalna mišićna funkcija dijafragme može biti očekivana pri dozama $CED_{45}\text{-K027} = 18 \mu\text{mol/kg}$ i $CED_{45}\text{-K203} = 100 \mu\text{mol/kg}$.

Iako je u našoj studiji pokazana najmanja sposobnost oksima da reaktiviraju AChE mozga, što je u saglasnosti sa nalazima niske bioraspoloživosti K-oksima u ovom tkivu, promena reaktivacije u funkciji doze oksima je bila značajno veća u mozgu (najmanja vrednost CED odnosa) u odnosu na dijafragmu i eritrocite, što potvrđuje visoku specifičnost za mehanizam reaktivacije AChE na nivou moždanog tkiva. Promene reaktivacije AChE u eritrocitima i dijafragmi u funkciji doza K-oksima nisu mogle biti statistički razlikovane zbog preklapanja intervala pouzdanosti CED odnosa, ali uočava se tendencija manje promene reaktivacije u funkciji doze oksima u dijafragmi u odnosu na mozak i eritrocite. Ovo bi moglo biti delimično uslovljeno uključivanjem direktnih antagonističkih efekata oksima K203 i K027 na nikotinske i muskarinske receptore neuromuskularne sinapse (pored reaktivacije AChE), što je i pokazano *in vitro* (Soukup i sar., 2011b, 2011a), s obzirom na metodološku činjenicu da krive doza-odgovor ne odslikavaju mehanizam dejstva jedinjenja (Slob i sar., 2005). Takođe, uočava se da je sa smanjenjem promene reaktivacije u funkciji doza K-oksima u dijafragmi došlo do smanjenja pouzdanosti procenjenih CED za ovaj efekat u poređenju sa eritrocitima i mozgom (Tabela 6, Tabela 8). Međutim, i pored toga osetljivost AChE dijafragme je bila veća u odnosu na eritrocite i mozak prema oksimu K027, dok za oksim K203 razlika u osetljivosti između dijafragme i eritrocita nije mogla biti ustanovljena.

Uključivanje atropina u terapiju uz oksim K027 ili K203, očekivano nije dovelo do značajnih promena ni maksimalnih efekata reaktivacije, ni stopa reaktivacije AChE (CED odnos).

Identifikacija ekviefektivnih doza oksima omogućila je izračunavanje terapiskih indeksa (Tabela 31) u cilju evaluacije specifične efikasnosti u relaciji sa njihovom akutnom toksičnošću (LD_{50}), pri čemu su upoređene gornje granice pouzdanosti ekviefektivnih doza oksima i njihova najviša testirana doza 50% LD_{50} , koja je u ovoj studiji identifikovana kao doza, pri kojoj i iznad koje se terapijski efekat ne može očekivati.

Širi terapijski indeks oksima K027 zajedno sa njegovom nižom ekviefektivnom dozom čini ga perspektivnijim oksimom u poređenju sa oksimom K203 zbog mogućnosti veće kumulativne doze u pogledu doznih režima oksima, koji uključuju dva klinička pristupa: ponavljana intermitentna primena ili kontinuirana infuzija nakon bolus doze (Eddleston i Chowdhury, 2016).

Tabela 31. Terapijski indeksi oksima K027 i K203 za efekat reaktivacije AChE

Tkivo	Oksim K027			Oksim K203		
	eritrociti	dijafragma	mozak	eritrociti	dijafragma	mozak
50% LD ₅₀ ($\mu\text{mol/kg}$)		1264			358	
CEDU _{AChE} ($\mu\text{mol/kg}$)	66	33	112	129	183	233
Terapijski indeks	19	38	11	3	2	2

Definisanje biološki značajnih veličina efekata zajedno sa naprednom BMD metodologijom sa kovarijansom, povećalo bi vrednost eksperimentalnih podataka o doznoj zavisnosti reaktivacije AChE oksimima i obezbedilo njihova robustna poređenja i interpretacije antidotske efikasnosti. Kvantifikacija 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 ljudsku populaciju.

5.2. Antioksidativna efikasnost oksima

Priridinijumski oksimi se koriste u terapiji trovanja OF kao jedini kauzalni antidoti sposobni da reaktiviraju forsorilisanu AChE i time smanje ekscitotoksičnost. Međutim, *in vitro* i *ex vivo* eksperimentima pokazano je da oksimi poseduju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (de Lima Portella i sar., 2008; Puntel i sar., 2009, 2008). *In vivo* disbalans između produkcije slobodno radikalskih vrsta i zaštite antioksidativnim odbrambenim sistemom dovodi do stanja oksidativnog stresa, koje može imati za posledicu oštećenje makromolekula ćelije (lipida, proteina, nukleinskih kiselina), remeteći tako ćelijsku strukturu i intraćelijsku signalizaciju. Stanje oksidativnog stresa je pokazano pri akutnoj i hroničnoj ekspoziciji OF na animalnim modelima i kod ljudi (Abdollahi i sar., 2004; Karami-Mohajeri i Abdollahi, 2013; Lukaszewicz-Hussain, 2010; Soltaninejad i Abdollahi, 2009) i dok je uloga piridinijumskih oksima u reaktivaciji AChE inhibirane OF dobro poznata (Antonijevic i Stojiljkovic, 2007; Gorecki i sar., 2016), njihovi potencijalni efekti na oksidativni stres indukovani OF, još uvek nisu u potpunosti proučeni.

Mnogi nalazi na eksperimentalnim modelima daju dokaze da akutna ekspozicija DDVP-u dovodi do stanja oksidativnog stresa: povećana aktivnost katalaze u kvascu (*Saccharomyces cerevisiae*) (Pachecka i Królewska, 1977); povećana lipidna peroksidacija (LPO) u azijskom peckavom somu (*Heteropneustes fossilis*) i oradi (*Sparus aurata*) (Vadhva i Hasan 1986; Varó et al. 2007); povećana aktivnost SOD, katalaze i glutathion peroksidaze, povećana LPO i smanjen glutathion praćeni smanjenjem AChE aktivnosti kod šarana (*Cyprinus carpio*) i Američkog somića (*Ictalurus nebulosus*) (Hai i sar., 1997). Dalje, poremećeni redoks status glutathiona, a koji je bio poboljšán pretretmanom *N*-acetilcisteinom, nađen je u jetri evropske jegulje (*Anguilla anguilla*) akutno izloženoj DDVP-u (Peña-Llopis i sar., 2003). Štaviše, veća stopa preživljavanja jegulja tretiranih *N*-acetilcisteinom u periodu ispitivanja tokom 96 h, u pomenutoj studiji, ukazalo je na potencijalni pozitivni efekat antioskidanasa u terapiji trovanja DDVP-om. Nađeno je da je povećano stvaranje reaktivnih kiseoničnih radikala i indukcija proteina toplotnog šoka (engl. *heat shock proteins*, *Hsp70*) prethodila promenama aktivnosti enzima

sistema antioksidativne zaštite i sadržajima glutaciona, MDA i proteinskih karbonilnih grupa kod transgene vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) akutno izložene DDVP-u (Gupta i sar., 2007, 2005). Dozno zavisno povećanje stope LPO nađeno u velikom i malom mozgu i moždanom stablu pacova akutno trovanih DDVP-om, bilo je podržano povećanom incidencijom granula lipofucin pigmenta u Purkinjeovim ćelijama u kori malog mozga (Hasan i Ali, 1981). Značajno veća aktivnost SOD i nivoa MDA nađeni su u krvi pacova trovanih DDVP-om u poređenju sa grupom koja je primala *N*-acetilcistein kao terapiju (Cankayali i sar., 2005). Viši nivoi MDA i niži nivoi tiola, kao i smanjena aktivnost enzima respiratornog lanca: NADH dehidrogenaze (kompleks I), sukcinat dehidrogenaze (kompleks II) i citohrom oksidaze (kompleks IV) nađeni su u kori velikog mozga, malom mozgu i moždanom stablu pacova akutno trovanih DDVP-om (Masoud i sar., 2009).

Dosadašnja slika DDVP-om indukovanih oksidativnog stresa nakon akutne ekspozicije, našom studijom je dopunjena i okarakterisana dodatnim biomarkerima na nivou ne samo najčešće ispitivanih tkiva, krvi i mozga, već i dijafragme. Stanje oksidativnog stresa 60 minuta nakon injektovanja DDVP-a (75% LD₅₀, s.c) potvrđeno je povišenim nivoima prooksidanasa i sniženim nivoima antioksidanasa, pri čemu je većina biomarkera u plazmi i dijafragmi bila značajno promenjena, dok je najveći poremećaj jednog biomarkera uočena kod TAS u mozgu pacova. Štaviše, detekcija MDA potvrdila je postojanje procesa lipidne peroksidacije na nivou sva tri tkiva, dok je u plazmi došlo i do oksidativnog oštećenja proteina. Nekoliko mehanizama može biti uključeno u nastanak oksidativnog stresa usled dejstva OF: ekscitotoksičnost usled masivne stimulacije holinergičkih receptora, aktivacija glutamatergične neurotransmisije, nastanak ishemije/reperfuzije, hiperglikemija, ali i metabolizam OF jedinstvom citohrom P450 enzima (Chen, 2012; Granger i Korthuis, 1995; Karami-Mohajeri i Abdollahi, 2013; Lukaszewicz-Hussain, 2010; Milatovic i sar., 2006, 2010). Smatra se da oksidativni stres, indukovani u akutnoj fazi ekspozicije, uz druge patofiziološke posledice ekscitotoksičnosti, takođe doprinosi razvoju odloženim neurološkim oštećenjima kod trovanja OF (Chen, 2012; Karami-Mohajeri i Abdollahi, 2013; Masoud i sar., 2009; Milatovic i sar., 2010). Mozak je posebno osetljivo tkivo na oksidativni stres zbog visoke potrošnje kiseonika, glukoze i energije, relativno niskog antioksidativnog kapaciteta i visoke

koncentracije polinezasićenih masnih kiselina (Floyd, 1996; Simonian i Coyle, 1996). Lipidna peroksidacija uz inflamaciju dovodi do oštećenja ćelijske membrane, što dalje ima za posledicu povećanje njene permeabilnosti i inaktivaciju receptora i jonskih kanala, pa čak i rupture (Mariani i sar., 2005; Porter i sar., 1995; Wang i Michaelis, 2010). Stoga, lipidna peroksidacija uz ekscitotoksičnost oštećuje cerebrovaskularni endotel i doprinosi povećanoj permeabilnosti krvno-moždane barijere usled dejstva OF, na čemu se zasnivaju objašnjenja prolaska oksimskih reaktivatora u mozak i njihovih centralnih efekata (Abdel-Rahman i sar., 2002; Ashani i Catravas, 1981; Bajgar i sar., 2007; Carpentier i sar., 1990; Firemark i sar., 1964; Granger i Korthuis, 1995; Kalász i sar., 2015; Karasova i sar., 2010; Lorke i sar., 2008b; Voicu i sar., 2010).

Antioksidativni efekti piridinijumskih oksima, su ispitani *in vivo* jedino kod trovanja tabunom i malationom na glodarima (Berend i sar., 2012; da Silva i sar., 2008; Dimov i sar., 2015; dos Santos i sar., 2011; Pohanka i sar., 2009, 2011b). Eksperimentalni oksim K027 (25% LD₅₀, *i.p.*, sa atropinom) značajno je smanjio malationom (1 g/kg, *s.c.*) indukovanu lipidnu peroksidaciju u prefrontalnom korteksu miša 24 h nakon trovanja i u isto vreme značajno reaktivirao inhibiranu AChE, sugerišući potencijanu vezu između holinergičke hiperstimulacije i oksidativnog stresa (da Silva i sar., 2008). Na osnovu određivanja antioksidanasa male molekulske težine (glutation, tioli, vitamin C), obidoksim i trimedoksim (5% LD₅₀, *i.m.*, sa atropinom) su smanjili oksidativni stres u plazmi pacova akutno trovanih tabunom (LD₅₀, *i.m.*), ali ne i u moždanom tkivu (Pohanka i sar., 2009). U drugoj studiji, takođe na osnovu nivoa antioksidanasa male molekulske težine, tabunom (LD₅₀, *i.m.*) indukovani oksidativni stres u plazmi pacova, bio je smanjen nakon tretmana obidoksimom, trimedoksimom, azoksimom i eksperimentalnim oksimima K203 i KR-22836 (60 µmol/kg, dati sa atropinom) (Pohanka i sar., 2011b). Dodatno, pralidoksim i eksperimentalni oksim K074 (25% LD₅₀, *i.m.*, dati sa atropinom) primenjenim 6 h nakon trovanja malationom (1,25 g/kg, *s.c.*) povećali su aktivnosti antioksidativnih enzima (glutation peroksidaze, glutacione reduktaze i katalaze) u prefrontalnom korteksu i hipokampusu miševa 24 h posle izlaganja malationu (dos Santos i sar., 2011). Sagledavanjem eksperimentalnih protokola navedenih *in vivo* studija, uočava se da su sve one ograničene na određivanje samo

komponentata 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. Sa druge strane, postoje i nalazi da, ne samo tabun (75% LD₅₀, *s.c.*), već i davanje oksima K203 odmah nakon tabuna (5% i 25% LD₅₀, *i.p.*, sa ili bez atropina) može da izazove produkciju slobodno radikalskih vrsta, na osnovu merenja MDA i SOD u plazmi pacova (Berend i sar., 2012). Hipotezom o oksimima-indukovanom oksidativnom stresu *in vivo* najviše su se bavili Pohanka i saradnici koji su ispitivali azoksimom i obidoksimom indukovani oksidativni stres u krvi, mozgu, jetri, bubregu, slezini glodara, kao i krvi pasa, međutim interpretacija rezultata nije jednostavna zbog različitih eksperimentalnih protokola i nekonzistentnih nalaza u pogledu podržavanja ili osporavanja hipoteze (Drtinova i sar., 2014; Pohanka i sar., 2011d, 2011e, 2011c). Dostupni *in vivo* podaci o oksimu K203 pokazuju da ovaj oksim povećava nivo antioksidanasa male molekulske težine u plazmi pacova dat *i.m.* u dozi 23 mg/kg (50 µmol/kg) (Karasova i sar., 2012). O oksimu K027 za sada postoje obećavajući podaci na ćelijama humanog hepatocelularnog karcinoma i neuroblastoma, koji potvrđuju da ne indukuje produkciju reaktivnih vrsta kiseonika, ne utiče na potencijal mitohondrija, glikolizu ili potrošnju kiseonika, ne povećava aktivnost kaspaza na osnovu čega je zaključeno da ne poseduje hepato- i neurotoksičan potencijal *in vitro* (u koncentraciji 10 µM) (Prado i sar., 2015). U saglasnosti sa ovim nalazom, oksim K027 (u koncentracijama do 800 µM) nije pokazao citotoksičnost na više ćelijskih linija u *in vitro* testu proliferacije ćelija (Čalić i sar., 2006), kao ni kolorimetrijskom testu sa 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijum bromidom i testu zasnovanom na impedanciji u realnom vremenu (Muckova i sar., 2019). U seriji *in vitro* testova pokazano je da oksim K027 poseduje nizak potencijal vezivanja za dezokisribonukleinsku kiselinu (DNK) telećeg timusa (Janockova i sar., 2014). Konačno, najnovija *in vitro* ispitivanja oksima K203 i K027 pokazala su da oni ne dovode do značajne inhibicije serije izoenzima citohroma P450 humane jetre, što predstavlja obećavajući nalaz sa aspekta interakcije sa drugim lekovima na nivou metabolizma u potencijalnoj kliničkoj primeni (Spicakova i sar., 2016).

Rezultati naše studije, pokazuju da svi ispitivani oksimi – obidoksim, trimedoksim, pralidoksim, azoksim, K027 i K203 u ekvitoksičnim dozama (5% LD₅₀, *i.m*) pokazuju potencijal da umanje oksidativni stres u plazmi i dijafragmi pacova akutno trovanih DDVP-om, 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.

U skladu sa selektivnom blokadom muskarinskih receptora čime se smanjuje hiperstimulacija ćelija endogenim AChE i posledična ekscitotoksičnost, nije bilo iznenađujuće što je terapija samo atropinom u našem eksperimentu, umanjila intenzitet oksidativnog stresa na nivou sva tri tkiva, kada se posmatra većina pojedinačnih prooksidativnih i antioksidativnih biomarkera. Međutim, jasno se uočava 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 ekvitoksičnoj dozi dobijena je veoma heterogena slika redoks statusa u ispitivanim tkivima, teška za interpretaciju s obzirom da je zajednički efekat na nivou pojedinih biomarkera bio i neočekivano lošiji u odnosu na efekat samostalno datih oksima. Interesantno je da je broj biomarkera redoks statusa na koje je značajno uticalo uključivanje atropina u terapiju u odnosu na efekat samih oksima bio najmanji u dijafragmi. Upravo na ovom tkivu se uočava da oksimi, sa izuzetkom obidoksima, dati sa atropinom nisu zaštitili lipide dijafragme od peroksidacije, kao što su to učinili kada su aplikovani samostalno.

Kvantitativna analiza antioksidativne efikasnosti oksima K203 i K027 pokazala je da se mogu identifikovati 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 ekviefektivnih doza jednog oksima za različite biomarkere ukazuje na kompleksnost redoks homeostaze na nivou različitih tkiva živog organizma, kao i kompleksnost karakterizacije ovakvog mehanizma dejstva oksimskih reaktivatora.

Ipak, visoko konzistentan nalaz unutar naše studije dobijen je kvantitativnim poređenjem antioksidativne efikasnosti dva K-oksima pri čemu je oksim K203 pokazao veću antioksidativnu potentnost/nije ekviefektivne doze na nivou sva tri ispitivana tkiva. Antioksidativni efekti oksima mogu biti indirektni – posledica pre svega specifičnog mehanizma dejstva, reaktivacije inhibirane AChE, kao i njihovih direktnih antinikotinskih i antimuskarinskih efekata čime se smanjuje OS indukovan ekscitotoksičnošću endogenog ACh. Međutim, rezultati naše studije o kvantitativnom poređenju antidotskih efekata oksima K027 i K203 pokazuju da oksim K027 koji je superiorniji od oksima K203 u efektu reaktivacije AChE nije to bio i u antagonizovanju oksidativnog stresa. Ovaj nalaz ide u prilog drugoj hipotezi o antioksidativnim efektima oksima kao posledici njihovih direktnih efekata neutralizacije različitih reaktivnih slobodno radikalskih vrsta, o čemu za sada postoje dokazi u *in vitro* uslovima za jedninjenja sa oksimskom funkcionalnom grupom, ali ne i za piridinijumske oksimske reaktivatore (de Lima Portella i sar.,

2008; Özen i Taş, 2009; Puntel i sar., 2009, 2008). U pogledu piridinijumskih oksima poznato je da su iminijum i oksimska funkcionalna grupa elektron-privlačne i omogućavaju molekulu različite redoks interakcije (Kovacic, 2003), a nedavna, elektrohemijska ispitivanja pokazala su oksidaciju oksimske grupe oksima K048, trimedoksima i azoksima, što ukazuje na delovanje protiv generacije slobodnih radikala (Novak i sar., 2013). Ovome mogu da idu u prilog i rezultati naše *in vivo* studije da je najveća prednost oksima K203 u poređenju sa oksimom K027 na nivou dijafragme i mozga bila upravo za efekat smanjenja nivoa superoksidnog anjona ($RPF_{K203}=5,3-5,9$, redom), a da je istovremeno na nivou dijafragme dobijena najveća prednost oksima K027 u reaktivaciji AChE sa gotovo jednakim faktorom potentnosti ($RPF_{K203}=5$). Svakako, neophodna su dalja *in vitro* istraživanja direktnih mehanizama antioksidativnih efekata oksimskih reaktivatora, ali i karakterizacija ovih efekata *in vivo* u cilju rasvetljavanja njihove biološke redoks aktivnosti.

Analizom dozne zavisnosti antioksidativnih efekata K-oksima u našoj studiji su takođe identifikovani i prooksidativni efekti visokih doza i to za oksim K203. Visoka koncentracija MDA u mozgu pacova dobijena pri najvišoj testiranoj dozi oksima K203 može biti i dodatno objašnjenje za pad aktivnosti AChE u ovom tkivu detektovan pri istoj dozi, s obzirom da je AChE enzim vezan za membrane ćelija, tako da je proces lipidne peroksidacije mogao oštetiti membranu i indirektno uticati na smanjenje aktivnosti enzima (Banerjee i sar., 1999; EFSA, 2013). Ovaj nalaz ide u prilog hipotezi da su ekscitotoksičnost i oksidativni stres mehanizmi koji se međusobno podržavaju.

Naša studija dala je jedinstvene podatke o antioksidativnim potencijalima dva eksperimentalna K-oksima, ali i 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. 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.

6. ZAKLJUČCI

Pri supkutanom akutnom trovanju pacova dimetil strukturnim modelom OF pesticida, dihlorvosom:

1. Najbolji antidotski efekat dobijen je nakon primene oksima K027. Efikasnost drugih ispitivanih oksima opadala je sledećim redosledom: obidoksim > oksim K203 > trimedoksima > pralidoksima > azoksim;
2. Najbolji antidotski efekat oksima datih u kombinaciji sa atropinom dobijen je nakon primene oksima K027 i obidoksimom, dok su antidotski efekti oksima K203, trimedoksima, pralidoksima i azoksima bili značajno niži;
3. Oksim K027 je sam i u kombinaciji sa atropinom jedini doveo do značajne reaktivacije AChE eritrocita i dijafragme. Nijedan od oksima datih samostalno ili u kombinaciji sa atropinom nije doveo do značajne reaktivacije AChE mozga.
4. Oksimi K027, K203 i obidoksim dati samostalno ili u kombinaciji sa atropinom doveli su do značajne reaktivacije BuChE plazme;
5. Analizom veze između primenjenih doza i reaktivatorskog potencijala dobijeno je da je oksim K027 značajno efikasniji u reaktivaciji AChE u odnosu na oksim K203: na nivou eritrocita i mozga dva puta, a na nivou dijafragme pet puta;
6. Ekviefektivne doze oksima K027 bile su niže od ekviefektivnih doza oksima K203 potrebnih za reaktivaciju u svim ispitivanim tkivima, dok su generalno najniže doze oksima K027 bile potrebne za reaktivaciju AChE dijafragme;
7. Subletalna doza dihlorvosa (75% LD₅₀) dovela je do stanja oksidativnog stresa, uz oksidativno oštećenje lipida u plazmi, dijafragmi i mozgu pacova, dok je u plazmi detektovano i oksidativno oštećenje proteina;
8. Svi ispitivani oksimi pozitivno su uticali na redoks status narušen dihlorvosom. Na nivou moždanog tkiva, na osnovu vrednosti indeksa oksidativnog stresa, najbolji antioksidativni potencijal pokazali su oksimi K027, K203 i obidoksim. U pogledu lipidne peroksidacije jedini oksim koji je pokazao antioksidativni potencijal bio je obidoksim. Oksim K027 i azoksim pokazali su antioksidativni potencijal na nivou proteina plazme. Svi oksimi su umanjili oksidativno oštećenje lipida dijafragme, a osim obidoksima, i oksidativno oštećenje na nivou mozga;

9. Primljeni u kombinaciji sa atropinom, u pogledu lipidne peroksidacije, jedino su trimedoksim i obidoksim ispoljili antioksidativni potencijal. Nijedna kombinacija oksima i atropina nije dovela do antioksidativnog efekta na nivou proteina plazme. Jedino je obidoksim u kombinaciji sa atropinom pokazao antioksidativni efekat na nivou lipida dijafragme, a K-oksimi, trimedoksim i pralidoksim su pokazali antioksidativni efekat na nivou lipida mozga;
10. Analizom veze između primenjenih doza i antioksidativnog potencijala dobijeno je da je oksim K203 značajno efikasniji u odnosu na oksim K027, pri čemu je najveća razlika u efikasnosti uočena za efekat smanjenja MDA u plazmi (osam puta), a za efekat smanjenja superoksidnog anjona u dijafragmi i mozgu (šest odnosno pet puta, redom).

Sumarno, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na bolji antidotski potencijal oksima K027 u odnosu na oksim K203 što podržava hipotezu o obećavajućoj hemijskoj strukturi oksima K027, vrednoj budućih *in vivo* ispitivanja kod strukturno različitih OF pesticida.

7. LITERATURA

- Aaron, C.K., 2001. Organophosphates and carbamates, in: Ford MD, Delaney KA, Ling LJ, Erickson T (Eds.), *Clinical Toxicology*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company.
- Abdel-Rahman, A., Shetty, A.K., Abou-Donia, M.B., 2002. Acute exposure to sarin increases blood brain barrier permeability and induces neuropathological changes in the rat brain: dose–response relationships. *Neuroscience* 113, 721–741.
- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaiee, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Rev.* 10, RA141–RA147.
- Abedin, M.J., Sayeed, A.A., Basher, A., Maude, R.J., Hoque, G., Faiz, M.A., 2012. Open-Label Randomized Clinical Trial of Atropine Bolus Injection Versus Incremental Boluses Plus Infusion for Organophosphate Poisoning in Bangladesh. *J. Med. Toxicol.* 8, 108–117.
- Acharya, J., Dubey, D.K., Kaushik, M.P., 2011a. In vitro reactivation potency of novel symmetrical bis-pyridinium oximes for electric eel acetylcholinesterase inhibited by nerve agent sarin. *Toxicol. In Vitro* 25, 2135–2139.
- Acharya, J., Dubey, D.K., Srivastava, A., Raza, S., 2011b. In vitro reactivation of sarin-inhibited human acetylcholinesterase (AChE) by bis-pyridinium oximes connected by xylene linkers. *Toxicol. In Vitro* 25, 251–256.
- Alamdari, D.H., Paletas, K., Pegiou, T., Sarigianni, M., Befani, C., Koliakos, G., 2007. A novel assay for the evaluation of the prooxidant–antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin. Biochem.* 40, 248–254.
- Alkondon, M., Rao, K.S., Albuquerque, E.X., 1988. Acetylcholinesterase reactivators modify the functional properties of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245, 543–556.
- Amitai, G., Kloog, Y., Balderman, D., Sokolovsky, M., 1980. The interaction of bis-pyridinium oximes with mouse brain muscarinic receptor. *Biochem. Pharmacol.* 29, 483–488.
- Amitai, G., Rabinovitz, I., Zomber, G., Chen, R., Cohen, G., Adani, R., Raveh, L., 1995. Antidotal efficacy of the bisquaternary oximes: AB-8, AB-13, toxogonin, HI-6 and HLo-7 against tabun and soman poisoning. Presented at the Proceedings 5th International Symposium Protection Against Chemical and Biological Warfare Agents, Stockholm, Sweden, pp. 11–16.
- Antonijević, B., Bokonjić, D., Stojiljković, M.P., Kilibarda, V., Milovanovi, Z.A., Nedeljkovi, M., Maksimovi, M., 2005. Efficacy of Trimedoxime in Mice Poisoned with Dichlorvos, Heptenophos or Monocrotophos. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96, 111–117.
- Antonijević, B., Stojiljkovic, M.P., 2007. Unequal Efficacy of Pyridinium Oximes in Acute Organophosphate Poisoning. *Clin. Med. Res.* 5, 71–82.
- Arshad, M., Fatmi, M.Q., Musilek, K., Hussain, A., Kuca, K., Petroianu, G., Kalasz, H., Nurulain, S.M., 2018. In silico and in vitro evaluation of two novel oximes (K378 and K727) in comparison to K-27 and pralidoxime against paraoxon-ethyl intoxication. *Toxicol. Mech. Methods* 28, 62–68.

- Artursson, E., Akfur, C., Hörnberg, A., Worek, F., Ekström, F., 2009. Reactivation of tabun-hAChE investigated by structurally analogous oximes and mutagenesis. *Toxicology* 265, 108–114.
- Ashani, Y., Catravas, G.N., 1981. Seizure-induced changes in the permeability of the blood-brain barrier following administration of anticholinesterase drugs to rats. *Biochem. Pharmacol.* 30, 2593–2601.
- Ashani, Y., Radic, Z., Tsigelny, I., Vellom, D.C., Pickering, N.A., Quinn, D.M., Doctor, B.P., Taylor, P., 1995. Amino Acid Residues Controlling Reactivation of Organophosphonyl Conjugates of Acetylcholinesterase by Mono- and Bisquaternary Oximes. *J. Biol. Chem.* 270, 6370–6380.
- 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.
- Auclair, C., Voisin, E., 1985. Nitroblue tetrazolium reduction, in: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 123–132.
- Aycicek, A., Erel, O., 2007. Total oxidant/antioxidant status in jaundiced newborns before and after phototherapy. *J. Pediatr. (Rio J.)* 83, 319–322.
- 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., Fusek, J., Kuca, K., Bartosova, L., Jun, D., 2007. Treatment of Organophosphate Intoxication Using Cholinesterase Reactivators: Facts and Fiction. *Mini Rev. Med. Chem.* 7, 461–466.
- 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.
- Balali-Mood, M., Abdollahi, M. (Eds.), 2014. *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds*. Springer-Verlag, London.
- Balali-Mood, M., Balali-Mood, K., 2008. Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements. *Arch. Iran. Med.* 11, 65–89.
- Balali-Mood, M., Balali-Mood, K., Hosseini Shirazi, F., 2006. Recent Advances In Treatment of Acute Organophosphorous Nerve Agents Poisoning. *Iran. J. Pharm. Res.* 5, 79–87.
- Balali-Mood, M., Shariat, M., 1998. Treatment of organophosphate poisoning. Experience of nerve agents and acute pesticide poisoning on the effects of oximes. *J. Physiol.-Paris* 92, 375–378.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T., Chakraborty, A.K., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol. Lett.* 107, 33–47.

- Banerjee, I., Tripathi, S.K., Roy, A.S., 2011. A Study on Comparative Evaluation of Add-on Pralidoxime Therapy over Atropine in the Management of Organophosphorus Poisoning in a Tertiary Care Hospital 13, 5.
- Bemis, J.C., Wills, J.W., Bryce, S.M., Torous, D.K., Dertinger, S.D., Slob, W., 2016. Comparison of in vitro and in vivo clastogenic potency based on benchmark dose analysis of flow cytometric micronucleus data. *Mutagenesis* 31, 277–285.
- Benschop, H.P., Van den Berg, G.R., Van Hoodonk, C., De Jong, L.P.A., Kientz, C.E., Berends, F., Kepner, L.A., Meeter, E., Visser, R.P.L.S., 1979. Antidotes to organophosphate poisoning. 2. Thiadiazole-5-carboxaldoximes. *J. Med. Chem.* 22, 1306–1313.
- Bentur, Y., Layish, I., Krivoy, A., Berkovitch, M., Rotman, E., Bar Haim, S., Yehezkeli, Y., Kozer, E., 2006. Civilian Adult Self Injections of Atropine – Trimedoxime (TMB4) Auto-Injectors. *Clin. Toxicol.* 44, 301–306.
- 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.
- Bhattacharjee, A.K., Marek, E., Le, H.T., Gordon, R.K., 2012. Discovery of non-oxime reactivators using an in silico pharmacophore model of oxime reactivators of OP-inhibited acetylcholinesterase. *Eur. J. Med. Chem.* 49, 229–238.
- Blumenberg, A., Benabbas, R., deSouza, I.S., Conigliaro, A., Paladino, L., Warman, E., Sinert, R., Wiener, S.W., 2018. Utility of 2-Pyridine Aldoxime Methyl Chloride (2-PAM) for Acute Organophosphate Poisoning: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Med. Toxicol.* 14, 91–98.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buckley, N.A., Eddleston, M., Li, Y., Bevan, M., Robertson, J., 2011. Oximes for acute organophosphate pesticide poisoning. *Cochrane Database Syst. Rev.*
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E., 2012. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 5th ed. Elsevier Health Sciences.
- Busker, R.W., Zijlstra, J.J., van der Wiel, H.J., Melchers, B.P.C., van Helden, H.P.M., 1991. Organophosphate poisoning: a method to test therapeutic effects of oxamines other than acetylcholinesterase activation in the rat. *Toxicology* 69, 331–344.
- 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.
- Carpentier, P., Delamanche, I.S., Le, M.B., Blanchet, G., Bouchaud, C., 1990. Seizure-related opening of the blood-brain barrier induced by soman: possible

- correlation with the acute neuropathology observed in poisoned rats. *Neurotoxicology* 11, 493–508.
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 2004. Organophosphate Toxicology: Safety Aspects of Nonacetylcholinesterase Secondary Targets. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 983–998.
- Chen, Y., 2012. Organophosphate-induced brain damage: Mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. *NeuroToxicology*, Special Review Section 33, 391–400.
- Cherian, A., Peter, J., Samuel, J., Jaydevan, R., Peter, S., Joel, S., Jeyasselan, L., Thomas, K., 1997. Effectiveness of 2-PAM (pralidoxime) in the treatment of organophosphorus poisoning (OPP): a randomized double blind placebo controlled clinical trial. *J. Assoc. Physicians India* 45, 22–4.
- Cherian, M., Roshini, C., Visalakshi, J., Jeyaseelan, L., Cherian, A., 2005. Biochemical and clinical profile after organophosphorus poisoning—a placebo-controlled trial using pralidoxime. *J. Assoc. Physicians India* 53, 427–431.
- Childs, A.F., Davies, D.R., Green, A.L., Rutland, J.P., 1955. The Reactivation by Oximes and Hydroxamic Acids of Cholinesterase Inhibited by Organo-Phosphorus Compounds. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 10, 462–465.
- Cohen, B.H., 2008. *Explaining Psychological Statistics*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- Connors, N.J., Harnett, Z.H., Hoffman, R.S., 2014. Comparison of Current Recommended Regimens of Atropinization in Organophosphate Poisoning. *J. Med. Toxicol.* 10, 143–147.
- Crump, K.S., 1984. A New Method for Determining Allowable Daily Intakes. *Toxicol. Sci.* 4, 854–871.
- 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.
- Dawson, R.M., 1995. Oxime effects on the rate constants of carbamylation and decarbamylation of acetylcholinesterase for pyridostigmine, physostigmine and insecticidal carbamates. *Neurochem. Int.* 26, 643–654.
- Dawson, R.M., 1994. Rate constants of carbamylation and decarbamylation of acetylcholinesterase for physostigmine and carbaryl in the presence of an oxime. *Neurochem. Int.* 24, 173–182.
- de Koning, M. C., Joosen, M.J.A., Noort, D., van Zuylen, A., Tromp, M.C., 2011. Peripheral site ligand–oxime conjugates: A novel concept towards reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 588–594.
- 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.
- de Silva, H.J., Wijewickrema, R., Senanayake, N., 1992. Does pralidoxime affect outcome of management in acute organophosphorus poisoning? *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 8802 339, 1136–1138.
- Dimov, D., Hadjiolova, R., Kanev, K., Tomova, R., Michova, A., Todorov, T., Murdjev, R., Boneva, T., Dimova, I., 2015. Cardiac and renal nitrosative-oxidative stress

- after acute poisoning by a nerve agent Tabun. *J. Environ. Sci. Health Part A* 50, 824–829.
- Dolgin, E., 2013. Syrian gas attack reinforces need for better anti-sarin drugs. *Nat. Med.* 19, 1194–1195.
- 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.
- Drtinova, L., Dobes, P., Pohanka, M., 2014. Low molecular weight precursor applicable for Alzheimer disease drugs synthesis (AChE and BChE inhibition, BACE inhibition, antioxidant properties and in silico modulation). *J. Appl. Biomed.* 12, 285–290.
- Durham, W.F., Hayes, W.J., 1962. Organic Phosphorus Poisoning and Its Therapy. *Arch. Environ. Health Int. J.* 5, 21–47.
- Eddleston, M., Buckley, N.A., Checketts, H., Senarathna, L., Mohamed, F., Sheriff, M.H.R., Dawson, A., 2004a. Speed of Initial Atropinisation in Significant Organophosphorus Pesticide Poisoning—A Systematic Comparison of Recommended Regimens. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42, 865–875.
- Eddleston, M., Buckley, N.A., Eyer, P., Dawson, A.H., 2008. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *The Lancet* 371, 597–607.
- Eddleston, M., Chowdhury, F.R., 2016. Pharmacological treatment of organophosphorus insecticide poisoning: the old and the (possible) new. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 81, 462–470.
- Eddleston, M., Dawson, A., Karalliedde, L., Dissanayake, W., Hittarage, A., Azher, S., Buckley, N.A., 2004b. Early management after self-poisoning with an organophosphorus or carbamate pesticide – a treatment protocol for junior doctors. *Crit. Care* 8, R391.
- Eddleston, M., Eyer, P., Worek, F., Juszczak, E., Alder, N., Mohamed, F., Senarathna, L., Hittarage, A., Azher, S., Jeganathan, K., Jayamanne, S., Meyer, L. von, Dawson, A.H., Sheriff, M.H.R., Buckley, N.A., 2009. Pralidoxime in Acute Organophosphorus Insecticide Poisoning—A Randomised Controlled Trial. *PLOS Med.* 6, e1000104.
- Eddleston, M., Phillips, M.R., 2004. Self poisoning with pesticides. *BMJ* 328, 42–44.
- EFSA, 2017. Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA J.* 15.
- EFSA, 2013. Scientific Opinion on the identification of pesticides to be included in cumulative assessment groups on the basis of their toxicological profile. *EFSA J.* 11.
- EFSA, 2011. Use of BMDS and PROAST software packages by EFSA Scientific Panels and Units for applying the Benchmark Dose (BMD) approach in risk assessment. *EFSA Support. Publ.* 8.
- EFSA, 2009. Guidance of the Scientific Committee on Use of the benchmark dose approach in risk assessment: Guidance of the Scientific Committee on Use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA J.* 7, 1150.
- Ekström, F., Hörnberg, A., Artursson, E., Hammarström, L.-G., Schneider, G., Pang, Y.-P., 2009. Structure of HI-6•Sarin-Acetylcholinesterase Determined by X-Ray

- Crystallography and Molecular Dynamics Simulation: Reactivator Mechanism and Design. *PLOS ONE* 4, e5957.
- Ekström, F., Pang, Y.-P., Boman, M., Artursson, E., Akfur, C., Börjegen, S., 2006. Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with HI-6, Ortho-7 and obidoxime: Structural basis for differences in the ability to reactivate tabun conjugates. *Biochem. Pharmacol.* 72, 597–607.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Erdmann, W.D., Clarmann, M. v., 1963. Ein neuer Esterase-Reaktivator für die Behandlung von Vergiftungen mit Alkylphosphaten. *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.* 88, 2201–2206.
- Eyer, F., Meischner, V., Kiderlen, D., Thiermann, H., Worek, F., Haberkorn, M., Felgenhauer, N., Zilker, T., Eyer, P., 2003. Human Parathion Poisoning. *Toxicol. Rev.* 22, 143–163.
- Eyer, F., Worek, F., Eyer, P., Felgenhauer, N., Haberkorn, M., Zilker, T., Thiermann, H., 2009. Obidoxime in acute organophosphate poisoning: 1 - clinical effectiveness. *Clin. Toxicol.* 47, 798–806.
- Eyer, P., 2007. In memory of Ilse Hagedorn. *Toxicology* 1, 3–7.
- Eyer, P., 2003. The Role of Oximes in the Management of Organophosphorus Pesticide Poisoning. *Toxicol. Rev.* 22, 165–190.
- Eyer, P., Eddleston, M., Thiermann, H., Worek, F., Buckley, N.A., 2008. Are we using the right dose? – A tale of mole and gram. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 66, 451–452.
- Eyer, P., Kawan, A., Ladstetter, B., 1987. Formation of cyanide after i. v. administration of the oxime HI 6 to dogs. *Arch. Toxicol.* 61, 63–69.
- Eyer, P.A., Worek, F., 2007. Oximes, in: *Chemical Warfare Agents*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 305–329.
- Firemark, H., Barlow, C.F., Roth, L.J., 1964. The penetration of 2-PAM-C into brain and the effect of cholinesterase inhibitors on its transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 145, 252–265.
- Floyd, R.A., 1996. The protective action of nitron-based free radical traps in neurodegenerative diseases, in: *Neurodegenerative Diseases*. Springer, pp. 235–245.
- Freeman, G., Epstein, M.A., 1955. Therapeutic Factors in Survival after Lethal Cholinesterase Inhibition by Phosphorus Insecticides. *N. Engl. J. Med.* 253, 266–271.
- Garcia, G.E., Campbell, A.J., Olson, J., Moorad-Doctor, D., Morthole, V.I., 2010. Novel oximes as blood–brain barrier penetrating cholinesterase reactivators. *Chem. Biol. Interact.*, 10th International Meeting on Cholinesterases 187, 199–206.
- Girotti, M., Khan, N., McLellan, B., 1991. Early Measurement of Systemic Lipid Peroxidation Products in plasma of major blunt trauma patients. *J. Trauma Acute Care Surg.* 31, 32–35.
- Gorecki, L., Korabecny, J., Musilek, K., Malinak, D., Nepovimova, E., Dolezal, R., Jun, D., Soukup, O., Kuca, K., 2016. SAR study to find optimal cholinesterase

- reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Arch. Toxicol.* 90, 2831–2859.
- Gorecki, L., Korabecny, J., Musilek, K., Nepovimova, E., Malinak, D., Kucera, T., Dolezal, R., Jun, D., Soukup, O., Kuca, K., 2017. Progress in acetylcholinesterase reactivators and in the treatment of organophosphorus intoxication: a patent review (2006–2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* 27, 971–985.
- Granger, D.N., Korthuis, R.J., 1995. Physiologic Mechanisms of Postischemic Tissue Injury. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 311–332.
- Grosfeld, H., Barak, D., Ordentlich, A., Velan, B., Shafferman, A., 1996. Interactions of oxime reactivators with diethylphosphoryl adducts of human acetylcholinesterase and its mutant derivatives. *Mol. Pharmacol.* 50, 639–649.
- Gupta, S.C., Siddique, H.R., Mathur, N., Vishwakarma, A.L., Mishra, R.K., Saxena, D.K., Chowdhuri, D.K., 2007. Induction of hsp70, alterations in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: Modulation by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1770, 1382–1394.
- Gupta, S.C., Siddique, H.R., Saxena, D.K., Chowdhuri, D.K., 2005. Hazardous effect of organophosphate compound, dichlorvos in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ): Induction of hsp70, anti-oxidant enzymes and inhibition of acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1725, 81–92.
- Hagedorn, I., Gündel, W., K. Schoene, 1969. Reaktivierung phosphorylierter Acetylcholin-Esterase mit Oximen: Beitrag zum Studium des Reaktionsablaufes. Cantor KG.
- Hai, D., Varga, S., Matkovics, B., 1997. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 117, 83–88.
- Harris, L.W., Talbot, B.G., Lennox, W.J., Anderson, D.R., 1989. The relationship between oxime-induced reactivation of carbamylated acetylcholinesterase and antidotal efficacy against carbamate intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98, 128–133.
- 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.
- Heath, A.J., Meredith, T.J., 1992. Atropine in the management of anticholinesterase poisoning., in: *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Butterworth-Heinemann Ltd, pp. 543–554.
- Heffron, P.F., Hobbiger, F., 1979. Relationship between inhibition of acetylcholinesterase and response of the rat phrenic nerve-diaphragm preparation to indirect stimulation at higher frequencies. *Br. J. Pharmacol.* 66, 323–329.
- Huizhen, G., Wenyang, J., Wei, Z., Haiyong, Z., Jin, J., Jie, Q., 2008. Comparison of three different administration methods of pralidoxime chloride in the treatment of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Chin. J. Crit. Care Med.* 28, 110–2.

- Janockova, J., Gulasova, Z., Plsikova, J., Musilek, K., Kuca, K., Mikes, J., Culka, L., Fedorocko, P., Kozurkova, M., 2014. Interaction of cholinesterase modulators with DNA and their cytotoxic activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 64, 53–62.
- Johnson, M.K., Jacobsen, D., Meredith, T.J., Eyer, P., Heath, A.J., Ligtenstein, D.A., Marrs, T.C., Szinicz, L., Vale, J.A., Haines, J.A., 2000. Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides. *Emerg. Med.* 12, 22–37.
- Jokanović, M., 2018. Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: A review. *Toxicology* 410, 125–131.
- Jokanović, M., Maksimović, M., 1995. A comparison of trimedoxime, obidoxime, pralidoxime and HI-6 in the treatment of oral organophosphorus insecticide poisoning in the rat. *Arch. Toxicol.* 70, 119–123.
- Jordanova E, Docovsky D, Miskova R, 1974. Hematologic and enzyme examinations in agricultural workers with acute intrathion poisoning. *Vatrechni Boles.* 13, 59–62.
- Jun, D., Musilova, L., Musilek, K., Kuca, K., 2011. In vitro ability of currently available oximes to reactivate organophosphate pesticide-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 2077–2087.
- 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.
- Kalász, H., Laufer, R., Szegi, P., Kuca, K., Musilek, K., Tekes, K., 2008. HPLC study of the pharmacokinetics of K-203. *Acta Chromatogr.* 20, 575–584.
- Kalász, H., Nurulain, S.M., Veress, G., Antus, S., Darvas, F., Adeghate, E., Adem, A., Hashemi, F., Tekes, K., 2015. Mini review on blood–brain barrier penetration of pyridinium aldoximes. *J. Appl. Toxicol.* 35, 116–123.
- Kalasz, H., Szegi, P., Janoki, G., Balogh, L., Postenyi, Z., Musilek, K., Petroianu, G., Siddiq, A., Tekes, K., 2013. Study on medicinal chemistry of K203 in wistar rats and beagle dogs. *Curr. Med. Chem.* 20, 2137–2144.
- Kalisiak, J., Ralph, E.C., Cashman, J.R., 2012. Nonquaternary Reactivators for Organophosphate-Inhibited Cholinesterases. *J. Med. Chem.* 55 (1), 465–474.
- Kalisiak, J., Ralph, E.C., Zhang, J., Cashman, J.R., 2011. Amidine–Oximes: Reactivators for Organophosphate Exposure *J. Med. Chem.*, 2011, 54 (9), 3319–3330.
- Karami-Mohajeri, S., Abdollahi, M., 2013. Mitochondrial dysfunction and organophosphorus compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 270, 39–44.
- Karasova, J., Hnídková, D., Pohanka, M., Musílek, K., Chilcott, R.P., Kuča, K., 2012. Pharmacokinetics of acetylcholinesterase reactivator K203 and consequent evaluation of low molecular weight antioxidants/markers of oxidative stress. *J. Appl. Biomed.* 10, 71–78.
- Karasova, J.Z., Kvetina, J., Tacheci, I., Radochova, V., Musilek, K., Kuca, K., Bures, J., 2017. Pharmacokinetic profile of promising acetylcholinesterase reactivators K027 and K203 in experimental pigs. *Toxicol. Lett.* 273, 20–25.
- Karasova, J.Z., Pohanka, M., Musilek, K., Zemek, F., Kuca, K., 2010. Passive diffusion of acetylcholinesterase oxime reactivators through the blood–brain barrier: Influence of molecular structure. *Toxicol. In Vitro* 24, 1838–1844.

- Karasová, J.Ž., Zemek, F., Kassa, J., Kuča, K., 2014. Entry of oxime K027 into the different parts of rat brain: Comparison with obidoxime and oxime HI-6. *J. Appl. Biomed.* 12, 25–29.
- Karasova, J.Z., Zemek, F., Musilek, K., Kuca, K., 2013. Time-dependent changes of oxime K027 concentrations in different parts of rat central nervous system. *Neurotox. Res.* 23, 63–68.
- 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., Karasová, J.Ž., Krejčiová, M., 2013a. Therapeutic efficacy of a novel bispyridinium oxime K203 and commonly used oximes (HI-6, obidoxime, trimedoxime, methoxime) in soman-poisoned male rats and mice. *J. Appl. Biomed.* 11, 7–13.
- Kassa, J., Karasova, J.Z., Musilek, K., Kuca, K., 2009b. A comparison of reactivating and therapeutic efficacy of newly-developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, HI-6) in cyclosarin-poisoned rats and mice. *Toxicol. Mech. Methods* 19, 346–350.
- Kassa, J., Karasová, J.Ž., Šepsová, V., Bajgar, J., 2011. A comparison of the reactivating and therapeutic efficacy of the newly developed bispyridinium oxime K203 with currently available oximes, in sarin poisoned rats and mice. *J. Appl. Biomed.* 9, 225–230.
- 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.
- Kassa, J., Zdarova Karasova, J., Sepsova, V., 2013b. A comparison of the reactivating efficacy of a novel bispyridinium oxime K203 with currently available oximes in VX agent-poisoned rats. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 28, 753–757.
- Kiderlen, D., Worek, F., Klimmek, R., Eyer, P., 2000. The phosphoryl oxime-destroying activity of human plasma. *Arch. Toxicol.* 74, 27–32.

- Kloog, Y., Sokolovsky, M., 1985. Bisquaternary pyridinium oximes as allosteric inhibitors of rat brain muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* 27, 418–428.
- Kotur-Stevuljevic, J., Bogavac-Stanojevic, N., Jelic-Ivanovic, Z., Stefanovic, A., Gojkovic, T., Joksic, J., Sopic, M., Gulan, B., Janac, J., Milosevic, S., 2015. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis* 241, 192–198.
- Kotur-Stevuljevic, J., Spasic, S., Jelic-Ivanovic, Z., Spasojevic-Kalimanovska, V., Stefanovic, A., Vujovic, A., Memon, L., Kalimanovska-Ostric, D., 2008. PON1 status is influenced by oxidative stress and inflammation in coronary heart disease patients. *Clin. Biochem.* 41, 1067–1073.
- Kovacic, P., 2003. Mechanism of Organophosphates (Nerve Gases and Pesticides) and Antidotes: Electron Transfer and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* 10, 2705–2709.
- Kovalevsky, A., Blumenthal, D.K., Cheng, X., Taylor, P., Radić, Z., 2016. Limitations in current acetylcholinesterase structure-based design of oxime antidotes for organophosphate poisoning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1378, 41–49.
- Kovarik, Z., Katalinić, M., Šinko, G., Binder, J., Holas, O., Jung, Y.-S., Musilova, L., Jun, D., Kuča, K., 2010. Pseudo-catalytic scavenging: Searching for a suitable reactivator of phosphorylated butyrylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.*, 10th International Meeting on Cholinesterases 187, 167–171.
- 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.
- Kozer, E., Mordel, A., Haim, S.B., Bulkowstein, M., Berkovitch, M., Bentur, Y., 2005. Pediatric poisoning from trimesoxime (TMB4) and atropine automatic injectors. *J. Pediatr.* 146, 41–44.
- Kuča, K., Bielavský, J., Cabal, J., Bielavská, M., 2003a. Synthesis of a potential reactivator of acetylcholinesterase—1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(carbamoylpyridinium)propane dibromide. *Tetrahedron Lett.* 44, 3123–3125.
- Kuča, K., Bielavský, J., Cabal, J., Kassa, J., 2003b. Synthesis of a new reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3545–3547.
- Kuca, K., Jun, D., Kassa, J., 2005. Strategy for the development of new acetylcholinesterase reactivators-antidotes used for treatment of nerve agent poisonings. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149, 429–31.
- 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.
- Kuhnen-Clausen, D., 1972. Structure-activity relationship of mono- and bisquaternary pyridines in regard to their parasympatholytic effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23, 443–454.
- Kuhnen-Clausen, D., 1970. Investigations on the parasympatholytic effect of toxogonin on the guinea-pig isolated ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 9, 85–92.

- Kuhnlen-Clausen, D., Hagedorn, I., Gross, G., Bayer, H., Hucho, F., 1983. Interactions of bisquaternary pyridine salts (H-Oximes) with cholinergic receptors. *Arch. Toxicol.* 54, 171–179.
- Kusic, R., Jovanovic, D., Randjelovic, S., Joksovic, D., Todorovic, V., Boskovic, B., Jokanovic, M., Vojvodic, V., 1991. HI-6 in Man: Efficacy of the Oxime in Poisoning by Organophosphorus Insecticides. *Hum. Exp. Toxicol.* 10, 113–118.
- LeBlanc, F.N., Benson, B.E., Gilg, A.D., 1986. A Severe Organophosphate Poisoning Requiring the Use of an Atropine Drip. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 24, 69–76.
- Lieske, C.N., Clark, J.H., Maxwell, D.M., Zoefel, L.D., Sultan, W.E., 1992. Studies of the amplification of carbaryl toxicity by various oximes. *Toxicol. Lett.* 62, 127–137.
- Litchfield, J., Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99–113.
- 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., Kalasz, H., Petroianu, G.A., Tekes, K., 2008b. Entry of Oximes into the Brain: A Review. *Curr. Med. Chem.* 15(8), 743-753.
- Lorke, D.E., Nurulain, S.M., Hasan, M.Y., Kuča, K., Musilek, K., Petroianu, G.A., 2008c. 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.
- Lovrić, J., Berend, S., Lucić Vrdoljak, A., Radić, B., Katalinić, M., Kovarik, Z., Želježić, D., Kopjar, N., Rast, S., Mesić, M., 2011. A conjugate of pyridine-4-aldoxime and atropine as a potential antidote against organophosphorus compounds poisoning. *Acta Biochim. Pol.* 58, 193–8.
- Luettringhaus, A., Hagedorn, I., 1964. [Quaternary hydroxyiminomethylpyridinium salts. The dischloride of bis-(4-hydroxyiminomethyl-1-pyridinium-methyl)-ether (LuH6), a new reactivator of acetylcholinesterase inhibited by organic phosphoric acid esters]. *Arzneimittelforschung.* 14, 1–5.
- Lukaszewicz-Hussain, A., 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98, 145–150.
- Lundy, P.M., Hamilton, M.G., Sawyer, T.W., Mikler, J., 2011. Comparative protective effects of HI-6 and MMB-4 against organophosphorous nerve agent poisoning. *Toxicology* 285, 90–96.
- Luo, C., Saxena, A., Smith, M., Garcia, G., Radić, Z., Taylor, P., Doctor, B.P., 1999. Phosphoryl Oxime Inhibition of Acetylcholinesterase during Oxime Reactivation Is Prevented by Edrophonium. *Biochemistry* 38, 9937–9947.
- Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A., Mecocci, P., 2005. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *J. Chromatogr. B, Analysis of Antioxidants and Biomarkers of Oxidative Stress* 827, 65–75.
- Marrs, T.C., 1991. Toxicology of oximes used in treatment of organophosphate poisoning. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* 10, 61–73.
- Marrs, Timothy C., Vale, J.A., 2006. CHAPTER 49 - Management of Organophosphorus Pesticide Poisoning, in: Gupta, R.C. (Ed.), *Toxicology of*

- Organophosphate & Carbamate Compounds. Academic Press, Burlington, pp. 715–733.
- Masoud, A., Kiran, R., Sandhir, R., 2009. Impaired Mitochondrial Functions in Organophosphate Induced Delayed Neuropathy in Rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 29, 1245–1255.
- Maxwell, D.M., Brecht, K.M., Koplovitz, I., Sweeney, R.E., 2006. Acetylcholinesterase inhibition: does it explain the toxicity of organophosphorus compounds? *Arch. Toxicol.* 80, 756.
- Melchers, B.P.C., Van der Laaken, A.L., Van Helden, H.P.M., 1991. On the mechanism whereby HI-6 improves neuromuscular function after oxime-resistant acetylcholinesterase inhibition and subsequent impairment of neuromuscular transmission. *Eur. J. Pharmacol.* 200, 331–337.
- Mercey, G., Verdelet, T., Renou, J., Kliachyna, M., Baati, R., Nachon, F., Jean, L., Renard, P.-Y., 2012. Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. *Acc. Chem. Res.* 45, 756–766.
- Mew, E.J., Padmanathan, P., Konradsen, F., Eddleston, M., Chang, S.-S., Phillips, M.R., Gunnell, D., 2017. The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006-15: Systematic review. *J. Affect. Disord.* 219, 93–104.
- Milatovic, D., Aschner, M., Gupta, R.C., Zaja-Milatovic, S., Barnes, G., 2010. Involvement of oxidative stress in anticholinesterase pesticide toxicity, in: Satoh, T. and Gupta R.C. (Ed.) *Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity and Epidemiology.* John Wiley & Sons, Inc, pp. 135-147.
- Milatovic, D., Gupta, R.C., Aschner, M., 2006. Anticholinesterase Toxicity and Oxidative Stress. *Sci. World J.* 6, 295–310.
- Milatović, D., Jokanović, M., 2009. CHAPTER 65 - Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators in the Treatment of OP Poisoning, in: Gupta, R.C. (Ed.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents.* Academic Press, San Diego, pp. 985–996.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Mittag, T.W., Ehrenpreis, S., Hehir, R.M., 1971. Functional acetylcholinesterase of rat diaphragm muscle. *Biochem. Pharmacol.* 20, 2263–2273.
- Muckova, L., Pejchal, J., Jost, P., Vanova, N., Herman, D., Jun, D., 2019. Cytotoxicity of acetylcholinesterase reactivators evaluated in vitro and its relation to their structure. *Drug Chem. Toxicol.* 42(3), 252-256.
- Musil, K., Florianova, V., Bucek, P., Dohnal, V., Kuca, K., Musilek, K., 2016. Development and validation of a FIA/UV-vis method for pKa determination of oxime based acetylcholinesterase reactivators. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 117, 240–246.
- Musilek, K., Dolezal, M., Gunn-Moore, F., Kuca, K., 2011a. Design, evaluation and structure—Activity relationship studies of the AChE reactivators against organophosphorus pesticides. *Med. Res. Rev.* 31, 548–575.
- 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, K., Holas, O., Kuca, K., Jun, D., Dohnal, V., Opletalova, V., Dolezal, M., 2008a. 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.
- Musilek, K., Holas, O., Misik, J., Pohanka, M., Novotny, L., Dohnal, V., Opletalova, V., Kuca, K., 2010. Monooxime-monocarbamoyl Bispyridinium Xylene-Linked Reactivators of Acetylcholinesterase—Synthesis, In vitro and Toxicity Evaluation, and Docking Studies. *ChemMedChem* 5, 247–254.
- 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., Komloova, M., Holas, O., Horova, A., Pohanka, M., Gunn-Moore, F., Dohnal, V., Dolezal, M., Kuca, K., 2011b. Mono-oxime bisquaternary acetylcholinesterase reactivators with prop-1,3-diyl linkage—Preparation, in vitro screening and molecular docking. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 754–762.
- Musilek, K., Kuca, K., Jun, D., Dolezal, M., 2007c. Progress in Synthesis of New Acetylcholinesterase Reactivators During the Period 1990-2004. *Curr. Org. Chem.* 11(2), 229-238.
- Musilek, K., Kucera, J., Jun, D., Dohnal, V., Opletalova, V., Kuca, K., 2008b. Monoquaternary pyridinium salts with modified side chain—synthesis and evaluation on model of tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 8218–8223.
- 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.
- Nakagawa, T., Tu, A.T., 2018. Murders with VX: Aum Shinrikyo in Japan and the assassination of Kim Jong-Nam in Malaysia. *Forensic Toxicol.* 36, 542–544.
- Namba, T., Hiraki, K., 1958. PAM (pyridine-2-aldoxime methiodide) therapy for alkylphosphate poisoning. *J. Am. Med. Assoc.* 166, 1834–1839.
- Namba, T., Nolte, C.T., Jackrel, J., Grob, D., 1971. Poisoning due to organophosphate insecticides: Acute and chronic manifestations. *Am. J. Med.* 50, 475–492.
- Namba, T., Taniguchi, Y., Okazaki, S., Uematsu, Y., Nagamatsu, H., Wakimoto, T., Hama, S., Nishishita, H., 1959. Treatment of severe organophosphorus poisoning by large doses of PAM. *Naika No Ryoiki Domain Intern Med* 7, 709–713.
- Novak, I., Komorsky-Lovrić, Š., Žunec, S., Lucić Vrdoljak, A., 2013. Anodic Behaviour of Some Bispyridinium Oximes on a Glassy-Carbon Electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.* 8, 9818 - 9834.
- Nurulain, S.M., Szegi, P., Tekes, K., Naqvi, S.N., 2013. Antioxidants in organophosphorus compounds poisoning. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 64, 169–176.
- Oh, K.-A., Park, N.-J., Park, N.-S., Kuca, K., Jun, D., Jung, Y.-S., 2008. Reactivation of DFP- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterases by pyridinium oximes.

- Chem. Biol. Interact., Proceedings of the IX International Meeting on Cholinesterases 175, 365–367.
- Oh, K.-A., Yang, G.Y., Jun, D., Kuca, K., Jung, Y.-S., 2006. Bis-pyridiumaldoxime reactivators connected with CH₂O(CH₂)_nOCH₂ linkers between pyridinium rings and their reactivity against VX. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 4852–4855.
- 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.
- Pachecka, J., Królewska, B., 1977. The effects of dichlorvos and trichlorphon on catalase induction, respiration and growth of yeast, *saccharomyces cerevisiae*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 342–348.
- Pang, Y.-P., Kollmeyer, T.M., Hong, F., Lee, J.-C., Hammond, P.I., Haugabouk, S.P., Brimijoin, S., 2003. Rational Design of Alkylene-Linked Bis-Pyridiniumaldoximes as Improved Acetylcholinesterase Reactivators. *Chem. Biol.* 10, 491–502.
- Pawar, K.S., Bhoite, R.R., Pillay, C.P., Chavan, S.C., Malshikare, D.S., Garad, S.G., 2006. Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a randomised controlled trial. *The Lancet* 368, 2136–2141.
- Pejchal, J., Osterreicher, J., Kuca, K., Jun, D., Bajgar, J., Kassa, J., 2008. The Influence of Acetylcholinesterase Reactivators on Selected Hepatic Functions in Rats. *Basic Amp Clin. Pharmacol. Amp Toxicol.* 103, 119–123.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat. Toxicol.* 65, 337–360.
- Peter, J.V., Sudarsan, T.I., Moran, J.L., 2014. Clinical features of organophosphate poisoning: A review of different classification systems and approaches. *Indian J. Crit. Care Med. Peer-Rev. Off. Publ. Indian Soc. Crit. Care Med.* 18, 735–745.
- 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.
- Petrova, I., Bielavsky, J., 2001. An overview of syntheses of cholinesterase reactivators from 1980 to 1992. *Voj Zdr. Listy* 70, 63–73.

- Pohanka, M., Karasova, J.Z., Musilek, K., Kuca, K., Jung, Y.-S., Kassa, J., 2011a. 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.
- Pohanka, M., Karasova, J.Z., Musilek, K., Kuca, K., Jung, Y.-S., Kassa, J., 2011b. 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.
- 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., Novotny, L., Fusek, J., Pikula, J., 2011c. HI-6 and obidoxime implication in oxidative stress, antioxidants level and apoptosis. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5, 1145–1149.
- Pohanka, M., Novotny, L., Zdarova-Karasova, J., Bandouchova, H., Zemek, F., Hrabanova, M., Misik, J., Kuca, K., Bajgar, J., Zitka, O., Cernei, N., Kizek, R., Pikula, J., 2011d. Asoxime (HI-6) impact on dogs after one and tenfold therapeutic doses: Assessment of adverse effects, distribution, and oxidative stress. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32, 75–81.
- Pohanka, M., Sobotka, J., Svobodova, H., Stetina, R., 2011e. Investigation of oxidative stress in blood, brain, kidney, and liver after oxime antidote HI-6 application in a mouse experimental model. *Drug Chem. Toxicol.* 34, 255–260.
- Pope, C., Karanth, S., Liu, J., 2005. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, The Ninth Meeting of the International Neurotoxicology Association (INA) 19, 433–446.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E., Mills, K.A., 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30, 277–290.
- Poziomek, E.J., Hackeley, B.E., Steinberg, G.M., 1958. Pyridinium Aldoximes1. *J. Org. Chem.* 23, 714–717.
- Prado, A., Petroianu, G.A., Lorke, D.E., Chambers, J.W., 2015. A trivalent approach for determining in vitro toxicology: Examination of oxime K027. *J. Appl. Toxicol.* 35, 219–227.
- Primožič, I., Odžak, R., Tomić, S., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., 2004. Pyridinium, imidazolium, and quinuclidinium oximes : synthesis, interaction with native and phosphorylated cholinesterases, and antidotes against organophosphates. *J. Med. Chem. Def.* 2, 1–30.
- Prüss-Üstün, A., Wolf, J., Corvalán, C., Bos, R., Neira, M., 2016. Preventing disease through healthy environments: a global assessment of the burden of disease from environmental risks. World Health Organization.
- 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.
- 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.

- Radchenko, E., Makhaeva, G., Malygin, V., Sokolov, V., Palyulin, V., Zefirov, N., 2008. Modeling of the relationships between the structure of O-phosphorylated oximes and their anticholinesterase activity and selectivity using molecular field topology analysis (MFTA). Presented at the Doklady Biochemistry and Biophysics, Springer, pp. 47–51.
- Radic, Z., Dale, T., Kovarik, Z., Berend, S., Garcia, E., Zhang, L., Amitai, G., Green, C., Radic, B., Duggan, B.M., Ajami, D., Rebek, J., Taylor, P., 2013. Catalytic detoxification of nerve agent and pesticide organophosphates by butyrylcholinesterase assisted with non-pyridinium oximes. *Biochem. J.* 450, 231–242.
- Radic, Z., Sit, R.K., Kovarik, Z., Berend, S., Garcia, E., Zhang, L., Amitai, G., Green, C., Radic, B., Fokin, V.V., Sharpless, K.B., Taylor, P., 2012. Refinement of structural leads for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases. *J. Biol. Chem.* 287(15), 11798–11809.
- Reiner, E., Simeon-Rudolf, V., 2006. Pyridinium, imidazolium and quinuclidinium compounds: toxicity and antidotal effects against the nerve agents tabun and soman. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 57, 171.
- Richter, R., Furlong, C., Clement, E., 1999. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenet. Genomics* 9, 745–53.
- Rodriguez-Llanes, J.M., Guha-Sapir, D., Schlüter, B.-S., Hicks, M.H.-R., 2018. Epidemiological findings of major chemical attacks in the Syrian war are consistent with civilian targeting: a short report. *Confl. Health* 12, 16.
- Samuel, J., Peter, J., Thomas, K., Jeyaseelan, L., Cherian, A., 1996. Evaluation of two treatment regimens of pralidoxime (1g single bolus dose vs 12g infusion) in the management of organophosphorus poisoning. *J. Assoc. Physicians India* 44, 529–31.
- Sanson, B., Nachon, F., Colletier, J.-P., Froment, M.-T., Toker, L., Greenblatt, H.M., Sussman, J.L., Ashani, Y., Masson, P., Silman, I., Weik, M., 2009. Crystallographic Snapshots of Nonaged and Aged Conjugates of Soman with Acetylcholinesterase, and of a Ternary Complex of the Aged Conjugate with Pralidoxime. *J. Med. Chem.* 52, 7593–7603.
- Seeger, T., Niessen, K.V., Langer, P., Gerhardus, J., Worek, F., Friess, H., Bumm, R., Mihaljevic, A.L., Thiermann, H., 2011. Restoration of nerve agent inhibited muscle force production in human intercostal muscle strips with HI 6. *Toxicol. Lett.* 206, 72–76.
- Simonian, N., Coyle, J., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 83–106.
- Sit, R., Radic, Z., Gerardi, V., Zhang, L., Garcia, E., Katalinic, M., Amitai, G., Kovarik, Z., Fokin, V., Sharpless, K.B., Taylor, P., 2011. New structural scaffolds for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases. *J. Biol. Chem.* 286(22), 19422–19430.
- Slob, W., 2017. A general theory of effect size, and its consequences for defining the benchmark response (BMR) for continuous endpoints. *Crit. Rev. Toxicol.* 47, 342–351.
- Slob, W., 2014a. Benchmark dose and the three Rs. Part II. Consequences for study design and animal use. *Crit. Rev. Toxicol.* 44, 568–580.

- Slob, W., 2014b. Benchmark dose and the three Rs. Part I. Getting more information from the same number of animals. *Crit. Rev. Toxicol.* 44, 557–567.
- Slob, W., 2002a. Dose-response modeling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 66, 298–312.
- Slob, W., 2002b. Dose-Response Modeling of Continuous Endpoints. *Toxicol. Sci.* 66, 298–312.
- Slob, W., Moerbeek, M., Rauniomaa, E., Piersma, A.H., 2005. A Statistical Evaluation of Toxicity Study Designs for the Estimation of the Benchmark Dose in Continuous Endpoints. *Toxicol. Sci.* 84, 167–185.
- Slob, W., Setzer, R.W., 2014. Shape and steepness of toxicological dose–response relationships of continuous endpoints. *Crit. Rev. Toxicol.* 44, 270–297.
- Soeteman-Hernández, L.G., Johnson, G.E., Slob, W., 2015. Estimating the carcinogenic potency of chemicals from the in vivo micronucleus test. *Mutagenesis* 31, 347–358.
- Sogorb, M.A., Vilanova, E., 2010. Detoxication of anticholinesterase pesticides, in: *Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity, and Epidemiology*. Edited by Tetsuo Satoh Ramesh C. Gupta. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 121–132.
- 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.
- Soukup, O., Krusek, J., Kaniakova, M., Kumar, U., Oz, M., Jun, D., Fusek, J., Kuca, K., Tobin, G., 2011a. Oxime reactivators and their in vivo and in vitro effects on nicotinic receptors. *Physiol Res* 60, 679–686.
- Soukup, O., Kumar, U., Proska, J., Bratova, L., Adem, A., Jun, D., Fusek, J., Kuca, K., Tobin, G., 2011b. The effect of oxime reactivators on muscarinic receptors: functional and binding examinations. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 364–370.
- Spicakova, A., Anzenbacher, P., Liskova, B., Kuca, K., Fusek, J., Anzenbacherova, E., 2016. Evaluation of possible inhibition of human liver drug metabolizing cytochromes P450 by two new acetylcholinesterase oxime-type reactivators. *Food Chem. Toxicol.* 88, 100–104.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253, 872–879.
- Syed, S., Gurcoo, S.A., Farooqui, A.K., Nisa, W., Sofi, K., Wani, T.M., 2015. Is the World Health Organization-recommended dose of pralidoxime effective in the treatment of organophosphorus poisoning? A randomized, double-blinded and placebo-controlled trial. *Saudi J. Anaesth.* 9, 49–54.
- Tattersall, J., Smith, A., Waters, K., Mistry, R., Weeden, D., 1998. Therapeutic action of HI-6 against soman poisoning in vitro: an interspecies comparison. *Br. J. Pharmacol.* 125, 7P.
- Tattersall, J.E.H., 1993. Ion channel blockade by oximes and recovery of diaphragm muscle from soman poisoning in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 108, 1006–1015.
- 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.

- Thiermann, H., Eyer, P., Worek, F., 2005a. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chem. Biol. Interact.* 157–158, 345–347.
- Thiermann, H., Eyer, P., Worek, F., Szinicz, L., 2005b. Effects of oximes on muscle force and acetylcholinesterase activity in isolated mouse hemidiaphragms exposed to paraoxon. *Toxicology, The Toxicologist and the Response to Incidents with Chemical and Biological Warfare Agents* 214, 190–197.
- Thiermann, H., Mast, U., Klimmek, R., Eyer, P., Hibler, A., Pfab, R., Felgenhauer, N., Zilker, T., 1997. Cholinesterase status, pharmacokinetics and laboratory findings during obidoxime therapy in organophosphate poisoned patients. *Hum. Exp. Toxicol.* 16, 473–480.
- Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, F., Worek, F., Eyer, P., Felgenhauer, N., Zilker, T., 1999. Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning. *Toxicol. Lett.* 107, 233–239.
- Thiermann, H., Worek, F., Kehe, K., 2013. Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. *Chem. Biol. Interact., Translation of experimental research for improved treatment of chemical warfare agent poisoning* 206, 435–443.
- 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.
- Thundiyil, J.G., Stober, J., Besbelli, N., Pronczuk, J., 2008. Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool. *Bull. World Health Organ.* 86, 205–9.
- Tougu, V., 2001. Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Curr. Med. Chem. - Cent. Nerv. Syst. Agents* 1, 155–170.
- US EPA, 2006. Organophosphorus Cumulative Risk Assessment 2006 Update.
- Vadhva P, Hasan M, 1986. Organophosphate dichlorvos induced dose-related differential alterations in lipid levels and lipid peroxidation in various regions of the fish brain and spinal cord. *J Env Sci Health Part B* 21, 413–24.
- Vale, J.A., OBE, T.C.M., CBE, R.L.M., 2018. Novichok: a murderous nerve agent attack in the UK. *Clin. Toxicol.* 56, 1093–1097.
- 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.
- van Helden, H.P.M., de Lange, J., Busker, R.W., Melchers, B.P.C., 1991. Therapy of organophosphate poisoning in the rat by direct effects of oximes unrelated to ChE reactivation. *Arch. Toxicol.* 65, 586–593.
- Varó, I., Navarro, J.C., Nunes, B., Guilhermino, L., 2007. Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. *Aquaculture* 266, 87–96.
- Voicu, V., Rădulescu, F.Ş., Medvedovici, A., 2013. Toxicological considerations of acetylcholinesterase reactivators. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 9, 31–50.
- Voicu, V.A., Bajgar, J., Medvedovici, A., Radulescu, F.S., Miron, D.S., 2010. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of some oximes and associated therapeutic consequences: a critical review. *J. Appl. Toxicol.* 30, 719–729.

- Vojvodic, V., Boskovic, B., 1976. A comparative study of pralidoxime, obidoxime and trimedoxime in healthy men volunteers and in rats. *Med. Prot. Chem.-Warf. Agents Stockh. Int. Peace Res. Inst.* 65–73.
- Vucinic, S., Bokonjic, D., Jokanović, J., 2018. Acute organophosphate poisoning: 17 years of experience of the National Poison Control Center in Serbia. *Toxicology*, 409, 73-79.
- Wang, X., Michaelis, E.K., 2010. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front. Aging Neurosci.* 2, 12.
- Willems, J.L., Bisschop, H.C.D., Verstraete, A.G., Declerck, C., Christiaens, Y., Vanscheeuwyck, P., Buylaert, W.A., Vogelaers, D., Colardyn, F., 1993. Cholinesterase reactivation in organophosphorus poisoned patients depends on the plasma concentrations of the oxime pralidoxime methylsulphate and of the organophosphate. *Arch. Toxicol.* 67, 79–84.
- Wills, J.W., Johnson, G.E., Battaion, H.L., Slob, W., White, P.A., Gollapudi, B., 2017. Comparing BMD-derived genotoxic potency estimations across variants of the transgenic rodent gene mutation assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 58, 632.
- Wills, J.W., Johnson, G.E., Doak, S.H., Soeteman-Hernández, L.G., Slob, W., White, P.A., 2016a. Empirical analysis of BMD metrics in genetic toxicology part I: in vitro analyses to provide robust potency rankings and support MOA determinations. *Mutagenesis* 31, 255–263.
- Wills, J.W., Long, A.S., Johnson, G.E., Bemis, J.C., Dertinger, S.D., Slob, W., White, P.A., 2016b. Empirical analysis of BMD metrics in genetic toxicology part II: in vivo potency comparisons to promote reductions in the use of experimental animals for genetic toxicity assessment. *Mutagenesis* 31, 265–275.
- Wilson, I., Ginsburg, S., 1955. A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* 18, 168–170.
- Wilson, I.B., 1951. Acetylcholinesterase XI. Reversibility of Tetraethyl Pyrophosphate Inhibition. *J. Biol. Chem.* 190, 111–117.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B., 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49, 1304–1313.
- Wong, L., Radić, Z., Brüggemann, R.J.M., Hosea, N., Berman, H.A., Taylor, P., 2000. Mechanism of Oxime Reactivation of Acetylcholinesterase Analyzed by Chirality and Mutagenesis. *Biochemistry* 39, 5750–5757.
- 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., Eyer, P., Kiderlen, D., Thiermann, H., Szinicz, L., 2000. Effect of human plasma on the reactivation of sarin-inhibited human erythrocyte acetylcholinesterase. *Arch. Toxicol.* 74, 21–26.
- Worek, F., Thiermann, H., 2013. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacol. Ther.* 139, 249–259.
- Worek, F., Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., 2004. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2237–2248.

- Worek, F., Thiermann, H., Wille, T., 2016. Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chem. Biol. Interact.*, 12th International Meeting on Cholinesterases and 6th Conference of Paraoxonase 259, 93–98.
- Yanagisawa, N., Morita, H., Nakajima, T., 2006. Sarin experiences in Japan: Acute toxicity and long-term effects. *J. Neurol. Sci., Terrorism for the Neurologist* 249, 76–85.
- Yang, G.Y., Oh, K.-A., Park, N.-J., Jung, Y.-S., 2007. New oxime reactivators connected with CH₂O(CH₂)_nOCH₂ linker and their reactivation potency for organophosphorus agents-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 7704–7710.
- Zemek, F., Zdarova, J.K., Sepsova, V., Kuca, K., 2013. Acetylcholinesterase Reactivators (HI-6, Obidoxime, Trimedoxime, K027, K075, K127, K203, K282): Structural Evaluation of Human Serum Albumin Binding and Absorption Kinetics. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 16076–16086.
- Zhengyuan, Z., 2006. Early and combined use of pralidoxime chloride and its effect. *Chin. J. Crit. Care Med.* 26, 939–940.
- Zilker, T., 2005. Medical management of incidents with chemical warfare agents. *Toxicology, The Toxicologist and the Response to Incidents with Chemical and Biological Warfare Agents* 214, 221–231.

Biografija autora

Evica Antonijević je rođena 1984. godine u Čačku. Osnovnu školu „Bora Stanković“ i Četvrtu gimnaziju završila je u Beogradu. Na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,39. Po obavljenom jednogodišnjem pripravničkom stažu položila je stručni ispit za diplomiranog farmaceuta 2011. godine pri Ministarstvu zdravlja, R. Srbije. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, modul Toksikologija, upisala je školske 2011/12. godine. Specijalističke akademske studije, studijski program Toksikološka procena rizika, na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu završila je školske 2013/14. godine.

Pohađala je veliki broj kurseva edukacije iz oblasti toksikologije i razvoja nastavničkih i saradničkih kompetencija.

Dobitnica je Godišnje nagrade Farmaceutskog fakulteta za naučno istraživačke radove studentata poslediplomskih studija u 2017. godini i Nagrade autorima sa Farmaceutskog fakulteta za rezultate publikovane u časopisima izuzetnih vrednosti (kategorija M21a) u 2018. godini.

Od 2012. godine zaposlena je u zvanju asistenta za užu naučnu oblast Toksikološka hemija na Katedri za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet.

Od 2012. godine učestvuje kao saradnik na projektu interdisciplinarnih istraživanja Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja R. Srbije (III46009). Učestvovala je kao saradnik na bilateralnom projektu između R. Srbije i R. Slovenije (2014-2015. godine), kao i između R. Srbije i R. Hrvatske (2016-2017. godine).

Objavila je do sada 9 naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja, 2 rada u časopisima nacionalnog značaja i preko 50 saopštenja na nacionalnim i međunarodnim naučnim skupovima.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Evica Antonijević
Broj indeksa: 31/11

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom
„Antidotska efikasnost novosintetisanih oksima K203 i K027 kod pacova akutno
trovanih dihlorvosom“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 15.04.2019. godine

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Evica Antonijević

Broj indeksa: 31/11

Studijski program: doktorske akademske studije, modul Toksikologija

Naslov rada: „Antidotska efikasnost oksima K203 i K027 kod pacova akutno trovanih dihlorvosom“

Mentor: prof. dr Biljana Antonijević

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, 15.04.2019. godine

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Antidotska efikasnost novosintetisanih oksima K203 i K027 kod pacova akutno trovanih dihlorvosom“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, 15.04.2019. godine

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.