

Odnos strukture i citotoksičnosti oksimskih reaktivatora fosfilirane acetilkolinesteraze

Zandona, Antonio

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:997120>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Antonio Zandona

**ODNOS STRUKTURE I CITOTOKSIČNOSTI
OKSIMSKIH REAKTIVATORA FOSFILIRANE
ACETILKOLINESTERAZE**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:
dr. sc. Maja Katalinić, v. znan. sur.

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Antonio Zandona

**STRUCTURE – CYTOTOXICITY RELATIONSHIP OF
OXIME REACTIVATORS OF PHOSPHYLATED
ACETYLCHOLINESTERASE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr Maja Katalinić, Senior Scientific Associate

Zagreb, 2021

Najveća hvala mentorici dr. sc. Maji Katalinić na ukazanom povjerenju, savjetima, prilikama za usavršavanje, vodstvu tijekom izrade doktorske disertacije te što je u svakom trenutku bila ovdje, bilo za riječi ohrabrenja u svim trenucima kad je krenulo nizbrdo, rješavanje problema, davanje pohvale ili svakodnevno čavrljanje.

Hvala svim kolegama Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju na ugodnoj radnoj atmosferi i pomoći kad god je trebalo, a posebice dr. sc. Zrinki Kovarik na potpori oko izrade disertacije.

Posebno hvala dr. sc. Sergeju Pirkmajeru i Katarini Miš, mag. pharm. (Institut za patofiziologiju, Ljubljana, Slovenija) na prenesenom znanju i pomoći u radu sa primarnim kulturama te western blot analizama.

Hvala dr. sc. Tamari Zorbaz i dr. sc. Josipu Maduniću na pomoći oko eksperimenata na staničnim linijama, dr. sc. Nikoli Marakoviću na pomoći s molekulskim modeliranjem te Petri Mišetić, mag. chem. i dr. sc. Jasni Padovan (Fidelta d.o.o., Zagreb, Hrvatska) na eksperimentima permeabilnosti membrane i određivanju metaboličke razgradnje spojeva.

Hvala dr. sc. Ivanu Pavičiću i dr. sc. Anamariji Marjanović Čermak na savjetima i pomoći u radu sa staničnim linijama pri mojim prvim laboratorijskim koracima.

Hvala dr. sc. Ines Primožič (Kemijski odsjek, PMF, Sveučilište u Zagrebu), dr. sc. Kamilu Musileku (Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Králové, Hradec Králové, Češka Republika), dr. sc. Ludovic Jeanu (Normandie Université, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA, UMR 6014, Rouen, Francuska) za sintezu spojeva korištenih u izradi ove disertacije.

Hvala Dori Raos, mag. mol. biol. i dr. sc. Nini Sinčiću (Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu) te dr. sc. Bojani Žeguri (Institut za biologiju, Ljubljana Slovenija) na ustupljenim uređajima za pojedina mjerenja.

Hvala curama iz jutarnje smjene na druženju i pretresanju svakodnevnice uz kavu.

Hvala roditeljima, bratu, obitelji i prijateljima što su uvijek bili tu za mene.

Hvala Beti na velikoj podršci, savjetima i što je uvijek znala uputiti prave riječi u pravo vrijeme: „Sve će biti dobro!“

Antonio Zandona

Sadržaj

SAŽETAK.....	VII
ABSTRACT	VIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Organofosforni spojevi	4
2.1.1. Klasifikacija organofosfornih spojeva	4
2.1.2. Mehanizam toksičnosti organofosfata.....	7
2.1.3. Terapija otrovanja organofosfatima.....	8
2.2. Oksimi	10
2.2.1. Oksimi u medicinskoj praksi	10
2.2.2. Modificirani piridinijevi i novosintetizirani nepiridinijevi oksimi	12
2.3. Razvoj novih protuotrova.....	15
2.3.1. Proces razvoja lijekova (protuotrova)	15
2.3.2. Ograničenja razvoja potencijalnih reaktivatora.....	17
2.3.3. Ispitivanja toksičnosti spojeva	19
2.3.4. Primjena stanični testova u razvoju novih protuotrova	20
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. Kemikalije, materijali i ostalo	25
3.1.1. Kemikalije, otapala, otopine i reagensi	25
3.1.2. Reagensi za western blot analize	28
3.1.3. Puferi.....	28
3.1.4. Oksimi	29
3.2. Stanične kulture	37
3.2.1. Uzgoj staničnih kultura.....	37
3.2.2. Određivanje broja stanica u uzorku.....	38
3.3. Stanični testovi in vitro.....	38
3.3.1. Određivanje citotoksičnosti oksima praćenjem promjene vijabilnosti stanica	38
3.3.2. Određivanje integriteta stanične membrane	41
3.3.3. Određivanje indukcije reaktivnih kisikovih vrsta.....	43
3.3.4. Određivanje antioksidacijskog potencijala stanice.....	43
3.3.5. Određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala	44
3.3.6. Određivanje indukcije procesa apoptoze	46

3.3.7. Određivanje aktivnosti specifičnih enzima kaspaza.....	47
3.3.8. Oštećenja molekula DNA.....	48
3.3.9. Permeabilnost membrane na modelu MDCK stanične linije.....	50
3.3.10. Određivanje metaboličke razgradnje oksima u mišjim mikrosomima.....	52
3.4. Određivanje i analiza ciljnih staničnih meta western blot tehnikom	53
3.5. In silico metode.....	54
3.5.1. Procjena fizikalno kemijskih svojstava	54
3.5.2. Procjena inhibicije specifičnih enzima CYP450 sustava oksimima	55
3.5.3. Generiranje farmakofora oksima i pretraživanje 3D baza podataka	55
3.6. Instrumenti korišteni za potrebna mjerenja	56
3.7. Statističke analize.....	57
§ 4. REZULTATI.....	58
4.1. Citotoksični učinak oksima na odabrane stanice	58
4.1.1. Toksičnost odabranih oksima nakon izloženosti stanica u trajanju od 24 sata	58
4.1.2. Toksičnost odabranih oksima nakon izloženosti stanica u trajanju od 1 i 4 sata	62
4.1.3. Odgovor stanice na djelovanje kombinacije dva odabrana oksima.....	66
4.2. Integritet membrane stanica nakon izloženosti oksimima	67
4.3. Oksidacijski stres u stanicama izloženih oksimima	69
4.3.1. Indukcija oksidacijskog stresa u stanicama.....	69
4.3.2. Promjena razine glutationa u stanicima.....	69
4.4. Mitohondrijski membranski potencijal ($\Delta\Psi_m$).....	70
4.5. Aktivacija programirane stanične smrti.....	71
4.5.1. Aktivacija procesa apoptoze	71
4.5.2. Aktivacija kaspaza odnosno cistein aspartat-specifičnih proteaza.....	72
4.6. Oštećenja molekule DNA uzrokovana oksimima.....	73
4.7. Fosforilacija specifičnih proteina određenih signalnih putova u stanicima.....	74
4.8. Pasivni prolazak oksima kroz staničnu membranu praćen na modelu MDCKII-MDR1 stanica.....	79
4.9. Metabolička stabilnost odabranih oksima	80
4.10. In silico računalna analiza svojstava i djelovanja oksima.....	82
4.10.1. Fizikalno kemijska svojstva	82
4.10.2. Utjecaj na enzime sustava citokrom P450.....	82
4.10.3. Usporedba oksima s ligandima poznatog djelovanja iz dostupnih baza pomoću farmakofornog modela.....	83
§ 5. RASPRAVA	86
§ 6. ZAKLJUČAK	93

§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (PREMA POTREBI)	95
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	99
§ 9. ŽIVOTOPIS	117



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ODNOS STRUKTURE I CITOTOKSIČNOSTI OKSIMSKIH REAKTIVATORA FOSFILIRANE ACETILKOLINESTERAZE

Antonio Zandona

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, 10000 Zagreb

Primjenom novog pristupa analizi baziranog na staničnim testovima *in vitro* proveden je probir pet serija strukturno povezanih oksima. Odabrani citotoksični bispiridinijevi i 3-hidroksi-2-piridinski oksimi inducirali su aktivaciju apoptoze, putom ovisnom o mitohondriju, aktivacijom enzima kaspaze 9 i/ili 3 uz oštećenje DNA i aktivaciju MAPK kinaze ili fosforilaciju acetyl-CoA karboksilaze. Nasuprot tome, imidazolijski i kinuklidinijevi oksimi uzrokovali su nereguliranu smrt stanice, nekrozu, pucanjem stanične membrane popraćenu oksidacijskim stresom, oštećenjem mitohondrija te smanjenom fosforilacijom izvanstanično reguliranih kinaza ERK1/2, uključenih u regulaciju diobe stanice. Kao potencijalne nove meta djelovanja ovih oksima, predviđene molekulskim modeliranjem farmakofora, istaknute su: beta-sekretaza 1, važna u nastajanju amiloid- β peptida kod Alzheimerove bolesti, aldehid dehidrogenaza A1, koja ima ulogu u Parkinsonovoj bolesti te citokrom P450cam iz *Pseudomonas putida*, što sugerira mogućnost inhibicije i ljudskih citokroma P450 sustava. Ovakav probir dao je smjernice za poboljšanje i razvoj strukture novih oksima, koje se mogu koristiti u bilo kojem istraživanju oblikovanja novih lijekova.

(VIII + 119 stranica, 41 slika, 20 tablica, 199 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: dizajn spojeva / integritet membrane / kaspaze / oksidacijski stres / stanična smrt / stanični testovi / toksičnost

Mentor: dr. sc. Maja Katalinić, v. znan. sur.

Rad prihvaćen: 2. lipnja 2021.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ines Primožič
2. dr. sc. Zrinka Kovarik, zn. savj. u tr. zv.
3. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zamjena: doc. dr. sc. Igor Stuparević



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

STRUCTURE – CYTOTOXICITY RELATIONSHIP OF OXIME REACTIVATORS OF PHOSPHYLATED ACETYLCHOLINESTERASE

Antonio Zandona

Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, HR-10000 Zagreb

Using a new approach to the analysis of *in vitro* cell-based assays, five series of structurally related oximes were tested. The selected cytotoxic bispyridinium and 3-hydroxy-2-pyridine oximes induced apoptosis via the mitochondrial-dependent pathway by caspase 9 and/or 3 activation accompanied with DNA damage, MAPK kinase activation or acetyl-CoA carboxylase phosphorylation. In contrast, imidazolium and quinuclidine oximes caused unregulated cell death, necrosis, and cell membrane burst accompanied by oxidative stress, mitochondrial damage, and decreased phosphorylation of extracellularly regulated ERK1/2 kinases involved in the regulation of cell division. The potential new targets of these oximes, predicted by computational modeling of pharmacophores, are: beta-secretase 1, important in the formation of amyloid- β peptide in Alzheimer's disease, aldehyde dehydrogenase A1, which plays a role in Parkinson's disease and cytochrome P450cam from *Pseudomonas putida*. This suggests the possibility of inhibition of human cytochrome P450 systems. Such screening provided guidelines for improving the development of the structure of new oximes, which can be used in any research for designing new drugs.

(VIII + 119 pages, 41 figures, 20 tables, 199 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: caspase / cell assays / cell death / compound design / membrane integrity / oxidative stress / toxicity

Supervisor: Dr. Maja Katalinić, Senior Research Associate

Thesis accepted: 2nd June 2021

Reviewers:

1. Dr. Ines Primožič, Professor
2. Dr. Zrinka Kovarik, Senior Scientific Advisor
3. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

Substitute: Dr. Igor Stuparević, Assistant Professor

§ 1. UVOD

Bolji odabir vodećeg kandidata za pretklinički razvoj lijekova postao je bezuvjetni zahtjev posljednjih godina. U tom su smislu rani, brzi i nepobitni rezultati koji nedvosmisleno rangiraju spojeve prema njihovim željenim i neželjenim učincima stavili fokus na toksikologiju *in vitro* koja se temelji na istraživanjima na stanicama, nadilazeći tako uvelike kritiziranu uporabu životinja u toksikološkim ispitivanjima¹. Područje istraživanja u kojem nedostaje odgovarajuća evaluacija spojeva koji se temelji na stanicama je istraživanje oksima kao protuotrova nakon otrovanja visokotoksičnim organofosfornim spojevima (OP). OP spojevi se upotrebljavaju u poljoprivrednoj, u području kontrole štetočina i u širokoj kemijskoj industriji². Zbog neselektivnosti prema vrstama, namjerno ili nenamjerno trovanje ljudi postalo je velik problem^{3,4}. Također, OP živčani bojni otrovi (sarin, tabun, VX), premda su zabranjeni međunarodnim konvencijama, još uvijek predstavljaju stvarnu prijetnju zbog zlouporabe u terorističkim napadima, čemu smo nažalost imali prilike svjedočiti u nedavnim događajima u svijetu⁵⁻⁷.

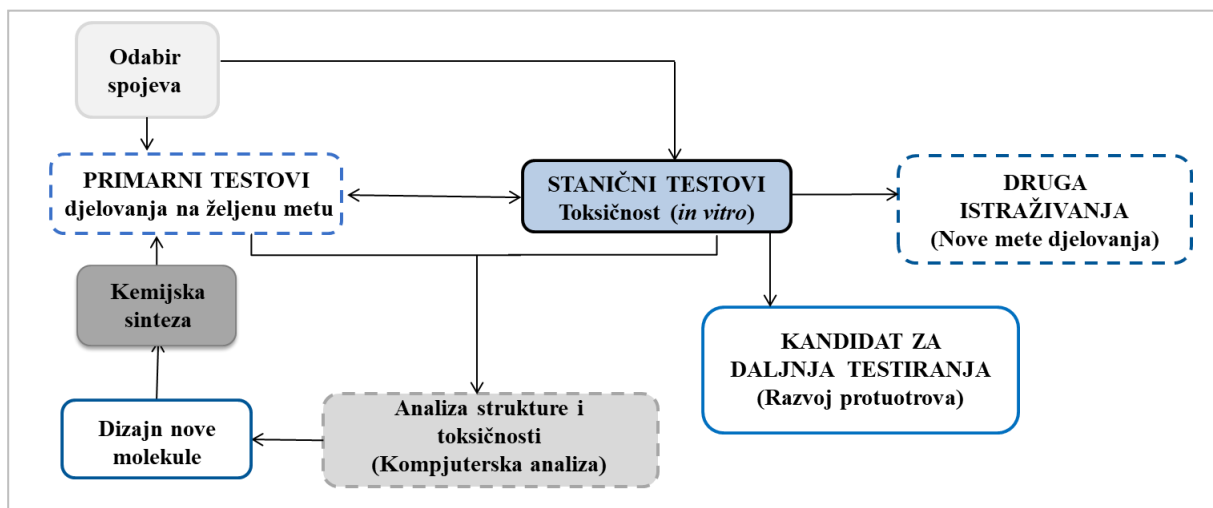
Oksimi su skupina spojeva koji mogu reaktivirati glavnu metu djelovanja OP spojeva, enzim acetilkolinesterazu (AChE, EC 3.1.1.7) tako što nukleofilnom supstitucijom uklanjaju OP vezan za katalitički centar. Do danas su u medicinsku praksu uvedena svega tri oksima (HI-6, 2-PAM, obidoksim) uskog opsega djelovanja. Potraga za novim učinkovitijim protuotrovima još uvijek traje. Danas se ispituju oksimi različite kemijske strukture kao mogući novi reaktivatori⁸⁻¹⁰. Vodeći kandidati koji pokazuju *in vitro* kinetički efikasnu i brzu reaktivaciju AChE inhibiranu OP-ima, se odabiru za daljnja ispitivanja *in vivo* najčešće na mišjim i štakorskim modelima^{11,12}, uglavnom bez primarnog provođenja ispitivanja toksičnosti na razini stanice¹³⁻¹⁵. Nakon preliminarnih ispitivanja *in vivo*, većina ih se isključuje iz daljnjih istraživanja ne samo zbog neučinkovitosti nego i zabilježenih nuspojava te mogućeg patološkog utjecaja na organe¹⁶⁻¹⁸. Naime, podaci *in vivo* istraživanja ukazuju na simptome poput miopatije i neuropatije uz ostale simptome djelovanja OP-a/protuotrova koji nisu izravno povezani uz inhibiciju AChE^{19,20}, te je važno istražiti koji su mogući učinci povezani s drugim enzimima i proteinima na razini stanice.

Cilj ove doktorske disertacije bio je primijeniti rani probir oksima temeljen na staničnim testovima te pokazati može li se toksični učinak na staničnoj razini povezati sa specifičnim

strukturnim elementima oksima. U tu svrhu ispitan je učinak pet različitih strukturno povezanih serija oksima na setu stanica te je određena citotoksičnost i aktivacija specifičnih markera staničnog zdravlja.

Istraživanja su uključivala oksime čija je reaktivacijska učinkovitost već poznata i istražena^{21,22}, neki od njih oblikovani su novim pristupom u kojem se lipofilne funkcionalne skupine uvode u osnovnu molekulu protuotrova kako bi se poboljšao prolazak kroz krvno-moždanu barijeru^{8,23–25}. Temeljem podataka iz literature, pretpostavlja se da bi, spojevi koji su lipofilniji i prelaze krvno moždanu barijeru, mogli utjecati i na druge mete u organizmu osim AChE i time imati potencijalno negativne učinke²⁴. Drugim riječima, nove molekule vjerojatno mogu imati ozbiljnije nuspojave zbog interakcija s ostalim nespecifičnim metama u organizmu *in vivo*. Po dobivanju rezultata primijenili smo pristup analize strukture i aktivnosti kako bi odredili moguće strukturne značajke/funkcionalne skupine ispitanih spojeva odgovorne za određene učinke poput: citotoksičnosti, indukcije reaktivnih kisikovih vrsta, aktivacije apoptoze, utjecaja na integritet membrane itd. Tako se strukturne značajke mogu modificirati u ranoj fazi poboljšanja strukture vodećeg spoja bez provođenja studija *in vivo*. To će omogućiti učinkovitije povratne informacije istraživačima koji rade na oblikovanju protuotrova i doprinijeti izazovnom razvoju djelotvornije terapije za slučajeve otrovanja OP spojevima. Nadalje, tako dobivene smjernice mogu se koristiti u bilo kojem istraživanju oblikovanja novih lijekova, jer su utvrđeni učinci specifičnih strukturnih značajki spoja na stanice konstantni^{23,25,26}.

Izrada ove disertacije uključivala je istraživanje opisano **slikom 1.1** koje je obuhvaćalo ispitivanje djelovanja strukturno različitih serija oksima u ovisnosti o vremenu i koncentraciji na setu odabranih ljudskih stanica. Također, u sklopu istraživanja određene su i nove moguće mete djelovanja odabranih oksima usporedbom sa strukturama poznatog djelovanja iz postojećih javnih baza podataka. Naime, interakcije odabranih oksima s drugim farmakološkim metama predstavljaju njihov novi terapijski potencijal. Bitno je naglasiti da su u istraživanju korištene isključivo ljudske stanice što je od velike koristi za procjenu rizika u situacijama koje uključuju ljude¹.



Slika 1.1. Shematski prikaz predloženog istraživanja ove doktorske disertacije.

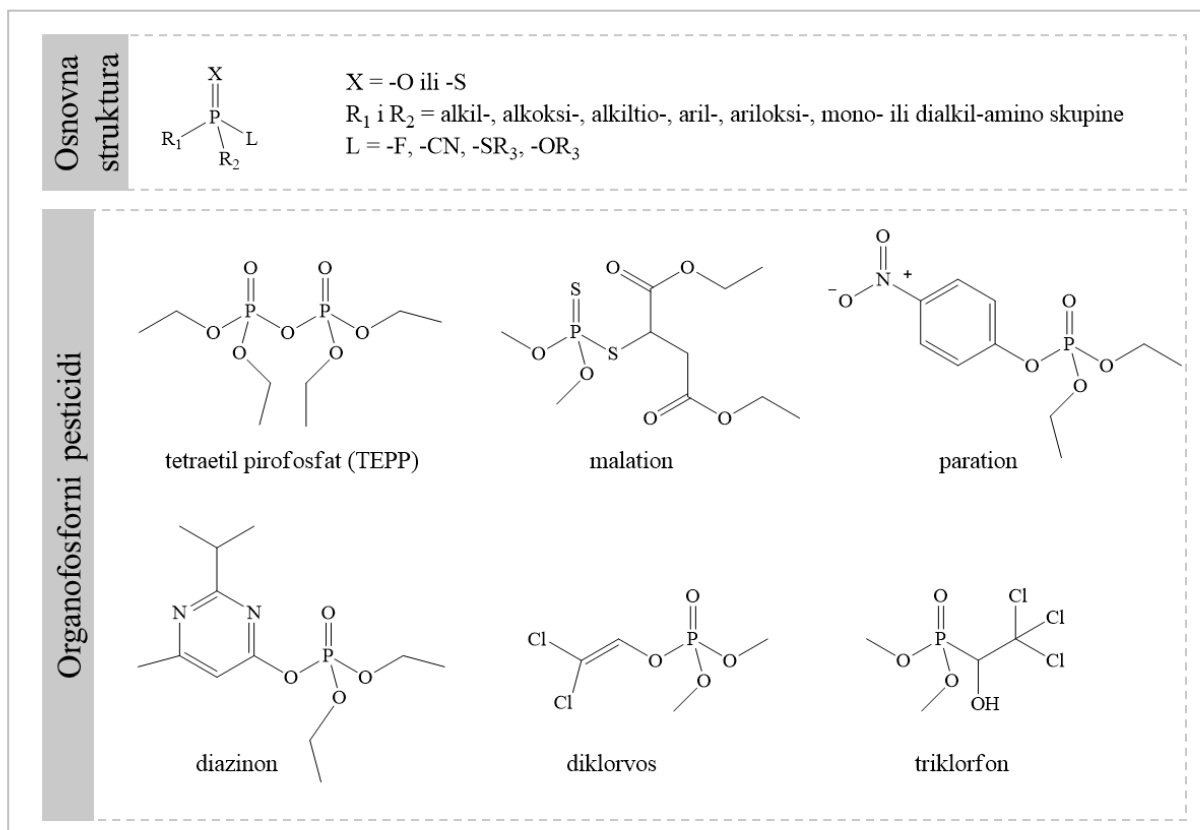
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Organofosforni spojevi

2.1.1. Klasifikacija organofosfornih spojeva

Organofosforni spojevi (OP) su visokotoksični esteri, anhidridi ili halogenidi potpuno supstituirane fosfatne, fosfonske ili fosfinske kiseline^{27–29}. Osnovnu strukturu organofosfornih spojeva čine peterovalentni središnji atom fosfora, kisik ili sumpor koji su na njega vezani koordinatno-kovalentnom vezom te pobočni ogranci (**slika 2.1**). Pobočni organci mogu biti alkil-, alkoksi-, alkiltio-, aril-, ariloksi-, mono- ili dialkil-amino skupine, dok je izlazna skupina najčešće fluor, cijano-, okso- ili tio- skupina²⁷. Prema tome, OP spojevi su fosfati, fosfonati, fosfinati ili ovisno određenim supstituentima na pobočnom ogranku, fosforotioati, fosfonotioati, fosforoditioati, fosforotritioati, fosforoamidati, fosforoamidotioati, fosforofluoridati, fosfonofluoridati, itd. Takvi spojevi ne postoje u prirodi, već su sintetskog porijekla. U suvremenom društvu, zastupljeni su kao različita maziva, ulja i vatrootporna sredstva u industrijama, živčani bojni otrovi ili kao pesticidi^{30–32}.

Porastom globalne populacije te sve većom potražnjom za hranom i bioenergentima, drastično je povećan uzgoj agrikultura te njihova prerada, a posljedično tome i potreba za primjenom pesticida. Preko 100 organofosfornih pesticida se koristi u zemljama širom svijeta³¹. Prvi poznati OP pesticid je tetraetil pirofosfat (TEPP) sintetiziran 1850-ih³³. TEPP-a se počeo koristiti kao insekticid, a skoro stotinu godina kasnije, nakon što je prepoznat njegov potencijal, sintetiziran je cijeli niz novih pesticida (paration, malation, diklorvos, triklorfon i diazinon, **slika 2.1**)³⁴. Zbog brze degradacije u prirodi, npr. malation se razgrađuje unutar 1 do 7 dana ovisno o vrsti tla³⁵, pesticidi se moraju upotrebljavati opetovano kako bi se održao željeni učinak. Iako se upotrebljavaju u kontroli korova i štetočina, zbog neselektivnosti prema vrstama, otrovanje OP spojevima je prisutno i predstavlja potencijalnu opasnost. Toksični OP pesticidi pod strogom su kontrolom, ali svake godine zabilježi se preko 3 milijuna otrovanja^{3,4}. Zbog neselektivnosti OP pesticida prema vrstama, ljudi se najčešće otruju njihovom ingestijom, inhalacijom ili asorpcijom kroz kožu^{36–38}.

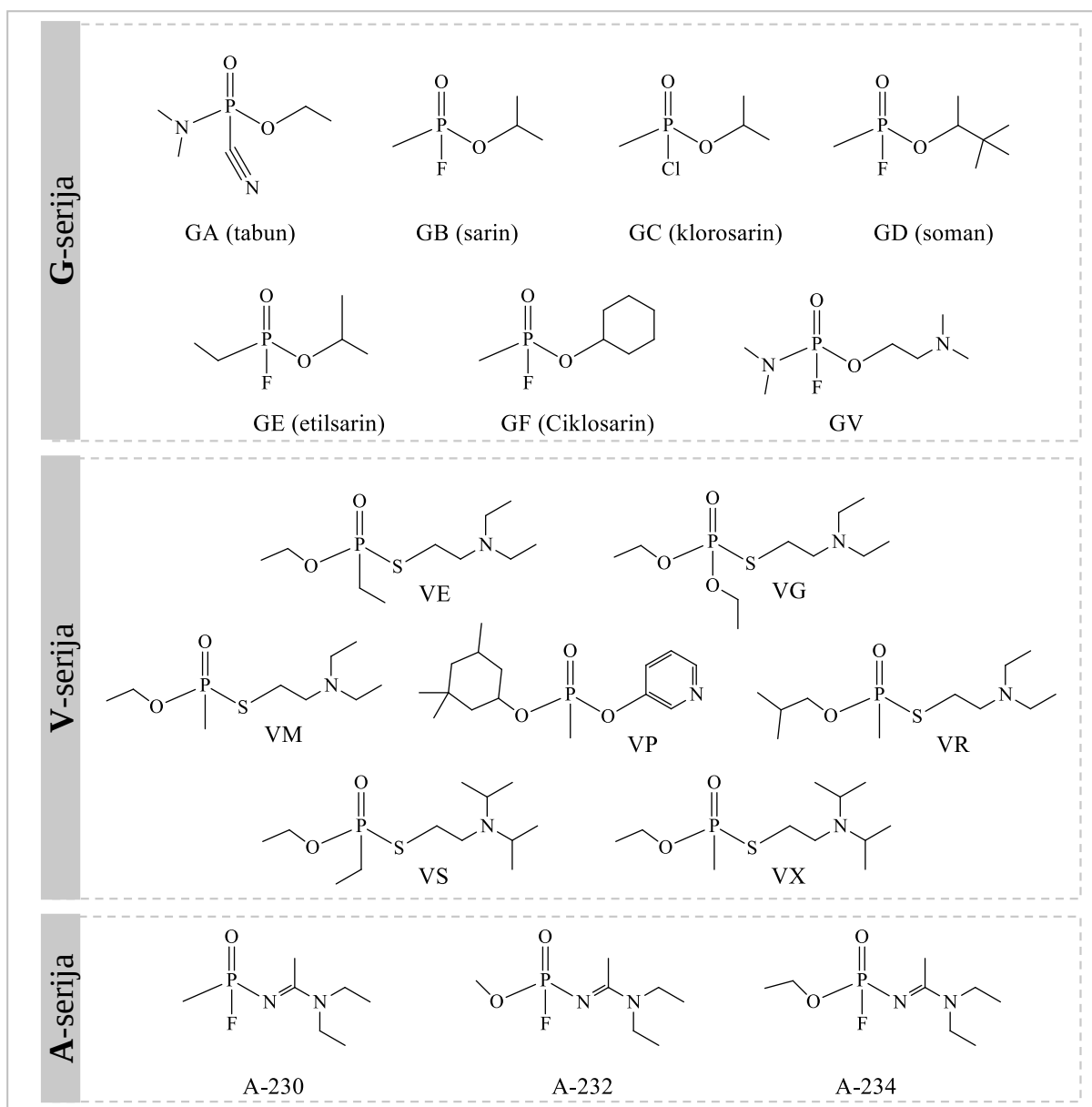


Slika 2.1. Kemijska struktura organofosforinih spojeva i najpoznatijih organofosforinih pesticida.

Visoka toksičnost pojedinih pesticida na ljude potencirala je njihovu primjenu u razvoju kemijskog oružja te su 1930-tih godina sintetizirani prvi organofosforini živčani bojni otrovi^{39–43}. Prvi takav OP spoj je bio tabun, sintetiziran u Njemačkoj 1936. godine⁴¹. U kratkom roku nakon toga, sintetizirano je još nekoliko sličnih struktura OP spojeva te su zajedno s tabunom svrstani u tzv. G-seriju (nazvanu prema skraćenici za „njemačke“ znanstvenike koji su ih sintetizirali, engl. *German*). U G-seriju spadaju živčani bojni otrovi tabun (GA), sarin (GB), klorosarin (GC), soman (GD), etilsarin (GE), ciklosarin (GF) i GV, a karakterizira ih iznimno laka hlapljivost (slika 2.2)^{32,41,42}. Tijekom Hladnog rata razvoj živčanih bojnih otrova, uz Njemačku, odvijao se i u Velikoj Britaniji, Sovjetskom Savezu te SAD-u^{27,44}. OP živčani bojni otrovi: VE, VG, VM, VP, VR, VS, VX (slika 2.2), koji su sintetizirani u tom periodu, spadaju u tzv. V-seriju (engl. *Venom* - „otrov“ ili engl. *Victory* - „pobjeda“). Spojevi u ovoj skupini su manje hlapljivi, no izrazito su toksični u kontaktu s kožom³².

Novichok ili A-serija (engl. *Newcomer*, *newbie* - „pridošlica“) je sintetizirana u periodu od 1980-ih do 1990-ih u Sovjetskom savezu⁴⁵. Novichoki su dizajnirani s ciljem razvoja najsmrtonosnijeg kemijskog oružja, kako bi bili nedetektibilni, neizlječivi, i razvijeni tajnim programom⁴⁶. Veliki problem je što ih se teško detektira te nedovoljno znanje o terapiji. Prema

kemijskoj strukturi ova serija OP spojeva svrstava se u fosforoamidate, kombinaciju spojeva G- i V-serije (**slika 2.2**), što ih čini najtoksičnijim poznatim organofosornim spojevima. Smatra se da su neki spojevi u A-seriji su čak 10 puta toksičniji od npr. somana^{45,46}.



Slika 2.2. Kemijske strukture organofosforinih živčanih bojnih otrova kategorizirane na osnovu sličnosti strukture u 3 serije: G-, V- i A-serija.

Mnoge zemlje su kroz povijest razvijale OP živčane bojne otrove, iako ih neke nikad nisu koristile^{41,42}. Od početka razvoja OP spojeva kao kemijskog oružja tj. živčanih bojnih otrova, upotreba u ratne svrhe je zabilježena svega nekoliko puta, posebno tijekom Iransko-Iračkog rata (1980. – 1988.), gdje je bilo preko tisuću mrtvih i 50 000 otrovanih ljudi⁴¹. Međutim upotreba

u terorističkim napadima i dalje je prisutna. Tako svjedočimo terorističkim napadima u Japanu (1994.), Siriji (2013. – 2017.), Maleziji (2017.)³⁹ i Velikoj Britaniji (2018.)⁴⁷.

Zbog izrazite toksičnosti i zbog potrebne kontrole razvoja živčanih bojnih otrova kao kemijskog oružja, 1997. zabranjena je proizvodnja, stvaranje zaliha i korištenje kemijskog oružja međunarodnom konvencijom koju je potpisalo 198 država⁴⁸. Uz to su do 2018. uništene postojeće deklarirane zalihe, a svaku upotrebu u istraživačke svrhe nadzire Organizacija za zabranu kemijskog oružja (engl. *Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*, OPCW). Ipak, još uvijek je prisutna opasnost od slučajnog ili namjernog otrovanja ljudi te zloupotrebe OP spojeva u terorističke svrhe^{5-7,49}, zbog čega je potrebno detaljno istražiti mehanizme njihova djelovanja na ljudski organizam te pronaći adekvatnu terapiju nakon otrovanja kako bi žrtve bile minimalne.

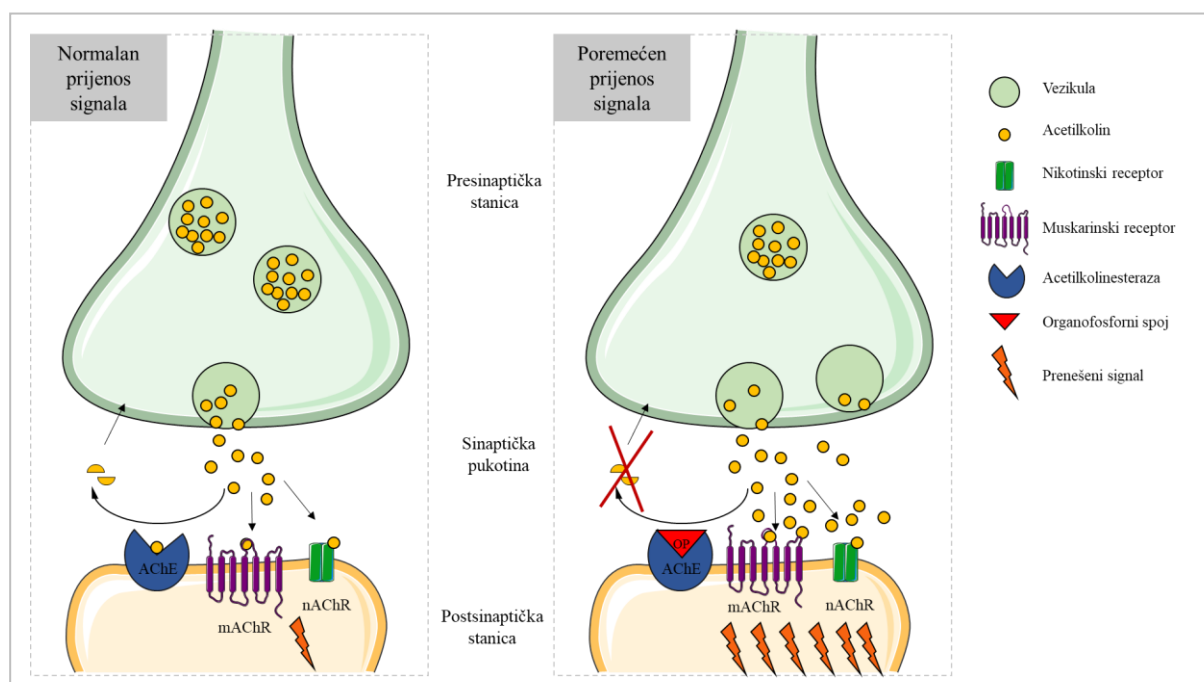
2.1.2. *Mehanizam toksičnosti organofosfata*

Ulaskom u organizam, OP-i stvaraju ireverzibilne komplekse s proteinima važnima za normalno funkcioniranje organizma poput serinskih hidrolaza: acetilkolinesteraze (AChE, EC 3.1.1.7), butirilkolinesteraze (BChE, EC 3.1.1.8), karboksilesteraze (CarbE; EC 3.1.1.1) te esteraze povezane s neuropatskim djelovanjem OP spojeva (NTE, engl. *neuropathy-target esterase*, EC 3.1.1.5)⁵⁰. Također mogu alkilirati molekule DNA te na taj način utjecati na poremećaj procesa replikacije⁵¹.

Primarni i patofiziološki najznačajniji mehanizam toksičnosti OP spojeva je ireverzibilna inhibicija aktivnosti AChE⁵². AChE je enzim od esencijalne važnosti za normalno funkcioniranje organizma, tj. prijenos živčanih impulsa, a u organizmu se nalazi u sinapsama živčanih i mišićnih stanica, i na eritrocitima⁵³. Primarna zadaća AChE je hidroliza živčanog prijenosnika acetilkolina (ACh), njenog fiziološkog supstrata, koji sudjeluje u prijenosu živčanog impulsa u kolinergičkom sustavu. Za vrijeme prijenosa signala, ACh se oslobađa iz vezikula u predsiniptičkoj stanici u sinaptičku pukotinu gdje se veže na nikotinske i muskarinske acetilkolinske receptore vezane na postsiniptičku živčanu ili mišićnu stanicu⁵⁴ (**slika 2.3**). Vezanjem ACh na navedene receptore omogućuje se daljnji prijenos signala te je nakon prijenosa signala, potrebna brza razgradnja ACh za koju je zadužena AChE⁵³.

OP-i utječu na kolinergički sustav tako što fosfilacijom aktivnog serina katalitičke trijade u aktivnom mjestu AChE ireverzibilno inhibiraju njezinu aktivnost. Budući da se AChE nalazi u sinaptičkim pukotinama, njenom inhibicijom onemogućuje se terminacija signala^{27,40}.

Ireverzibilnom inhibicijom AChE akumulira se ACh u sinapsama koji prekomjerno stimulira nikotinske i muskarinske receptore (**slika 2.3**) što posljedično dovodi do desenzibilizacije receptora i niza simptoma poput, nekontroliranih kontrakcija skeletnih mišića, odnosno tremora. Uz to, zbog nastale tzv. kolinergičke krize dolazi posljedično do poremećaja i ostalih neurotransmiterskih sustava koji dovode do zatajenja respiracijskog sustava te smrti⁵⁵⁻⁵⁷. U slučaju preživljenja, poremećaji na staničnoj razini mogu dovesti do dugoročnih posljedica za organizam, poput različitih mio- i neuropatija^{58,59}.



Slika 2.3. Prijenos signala u kolinergičkom sustavu: normalan prijenos signala i poremećen prijenos signala uslijed inhibicije AChE OP-spojem te prekomjerna stimulacija acetilkolinskih receptora.

Mehanizam vezanja OP spojeva u aktivno mjesto AChE analogan je mehanizmu vezanja fiziološkog supstrata ACh, samo što su OP-i sporo hidrolizirajući supstrati tj. spontana defosfilacija je neusporedivo sporiji proces od hidrolize supstrata i zbog toga OP-e ostaje vezan, a aktivnost AChE inhibirana. Stoga je potrebno ukloniti OP iz aktivnog mjesta i povratiti aktivnost inhibirane AChE djelovanjem nekog drugog spoja odnosno tzv. reaktivatora²⁷.

2.1.3. Terapija otrovanja organofosfatima

Terapija otrovanja organofosfatima se bazira na umanjeњу učinaka povišene koncentracije živčanog prijenosnika ACh u sinapsama^{60,61}. ACh ne može pasivno difundirati ili nestati iz sinapsa, nego ga je potrebno ukloniti. AChE je najbrži enzim koji ga hidrolizira iz sinapsa (400

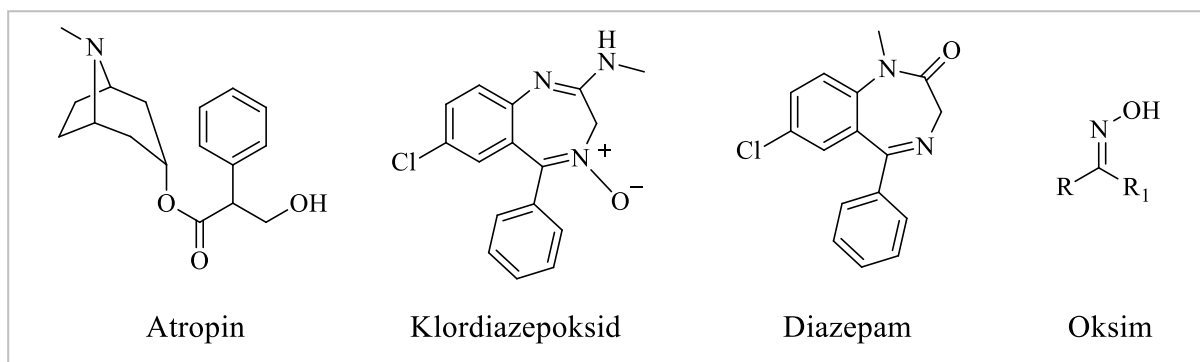
000 molekula po minuti)^{54,62}, stoga je od presudne važnosti povratiti aktivnost AChE kako bi se snizila povišena koncentracija ACh te smanjila prekomjerna stimulacija acetilkolinskih receptora.

U terapiji otrovanja OP-ima u praksi se danas koriste antikolinergik atropin, koji umanjuje senzibilizaciju muskarinskih simptoma vezanjem za muskarinske receptore, te antikonvulzivi benzodiazepini, agonisti nekolinergičkih receptora, kako bi se spriječili daljnji napadaji⁴³.

Atropin (**slika 2.4**) je alkaloid, prvi put dobiven iz ekstrakata biljke *Atropa belladonna* koji se kroz povijest primjenjivao u narodnoj medicini kao analgetik, u liječenju mentalnih oboljenja, vrućice, epilepsije, kožnih bolesti, dok su ga u privatnom životu žene koristile u kozmetičke svrhe za širenje zjenica⁶³. Tek je 1819. godine započelo ispitivanje njegovog fiziološkog utjecaja, a skoro stotinu godina kasnije prvi put je sintetiziran što je omogućilo njegovu upotrebu u klinici⁶⁴. Ispitivanja fiziološkog utjecaja atropina ukazala su na nuspojave poput suhih usta, širokih zjenica, konstipacije, ubrzanog rada srca, zbog čega se atropin ne upotrebljava kod pacijenata s glaukomom ili kod trudnica^{63,65}. Atropin se danas najčešće primjenjuje u medicinske svrhe pri operacijama jer smanjuje aktivnost žlijezda (manja salivacija), zatim kao mišićni relaksator, kao oftalmik u oftamologiji te kao terapeutik prilikom otrovanja organofosfornim spojevima^{63,66}.

Klordiazepoksid, komercijalnog naziv Librium, prvi je benzodiazepin predstavljen javnosti 1955. godine i odobren za kliničku upotrebu (**slika 2.4**). Koristio se prilikom liječenja od alkohola, anksioznosti i kao sedativ⁶⁷. Benzodiazepini su u kratkom vremenu postali izrazito popularni zbog niske toksičnosti te su uzrokovali manju ovisnost ili neželjene učinke od drugih lijekova⁶⁸. Godine 1963. sintetiziran je diazepam, komercijalnog naziva Valium (**slika 2.4**), koji je imao širi spektar djelovanja, a uz karakteristike klordiazepoksida koristio se za sediranje prije operacije ili pri intenzivnoj njezi pacijenata na respiratorima, prilikom različitih napadaja (npr. epilepsija) te pri grčanju skeletnih mišića⁶⁹. 1980-ih pokazalo se da korištenje benzodiazepina može uzrokovati ovisnost te da stariji pacijenti imaju slabiji terapijski odgovor uz pojačane nuspojave, što je dovelo do nove regulative za njihovu upotrebu. Petnaest godina nakon otkrivanja potencijala benzodiazepina, znanstvenici su utvrdili njihov inhibicijski učinak na gama-aminobutiričke (GABA) receptore u središnjem živčanom sustavu te je predstavljen čitav niz novosintetiziranih benzodiazepina (lorazepam, klonazepam, alprazolam, midazolam, triazolam itd.) s dodatnim karakteristikama poput liječenja nesanice i napadaja panike^{69,70}.

Iako atropin i benzodiazepini povećavaju preživljenje i umanjuju posljedice u terapiji otrovanja OP spojevima, imaju znatne nedostatke. Naime, atropin djeluje samo u prvoj kolinergičkoj fazi toksičnosti, dok benzodiazepini zbog svoje farmakokinetike nemaju dugo djelovanje pa se napadaji mogu ponovno pojaviti⁷¹. Osim toga, nijedan od tih lijekova ne djeluju na izvor problema, fosfiliranu AChE, odnosno ne reaktivira njezinu aktivnost. Povratak aktivnosti AChE, odnosno reaktivacija fosfilirane AChE, moguć je nukleofilnim spojevima kao što su oksimski spojevi (**slika 2.4**)^{72,73}. Oksimatni anion nukleofilnim napadom na aktivni serin u aktivnom mjestu AChE, reaktivira ga uklanjajući fosfiliranu grupu iz aktivnog mjesta enzima, čime se vraća aktivnost enzima. Dosadašnjim istraživanjima pokazalo se da je za sad najučinkovitija terapija otrovanja organofosfornim spojevima primjena kombinacije atropina, benzodiazepina i oksima⁷⁴, jer se djeluje i na receptore i na uklanjanje ACh iz sinapse.



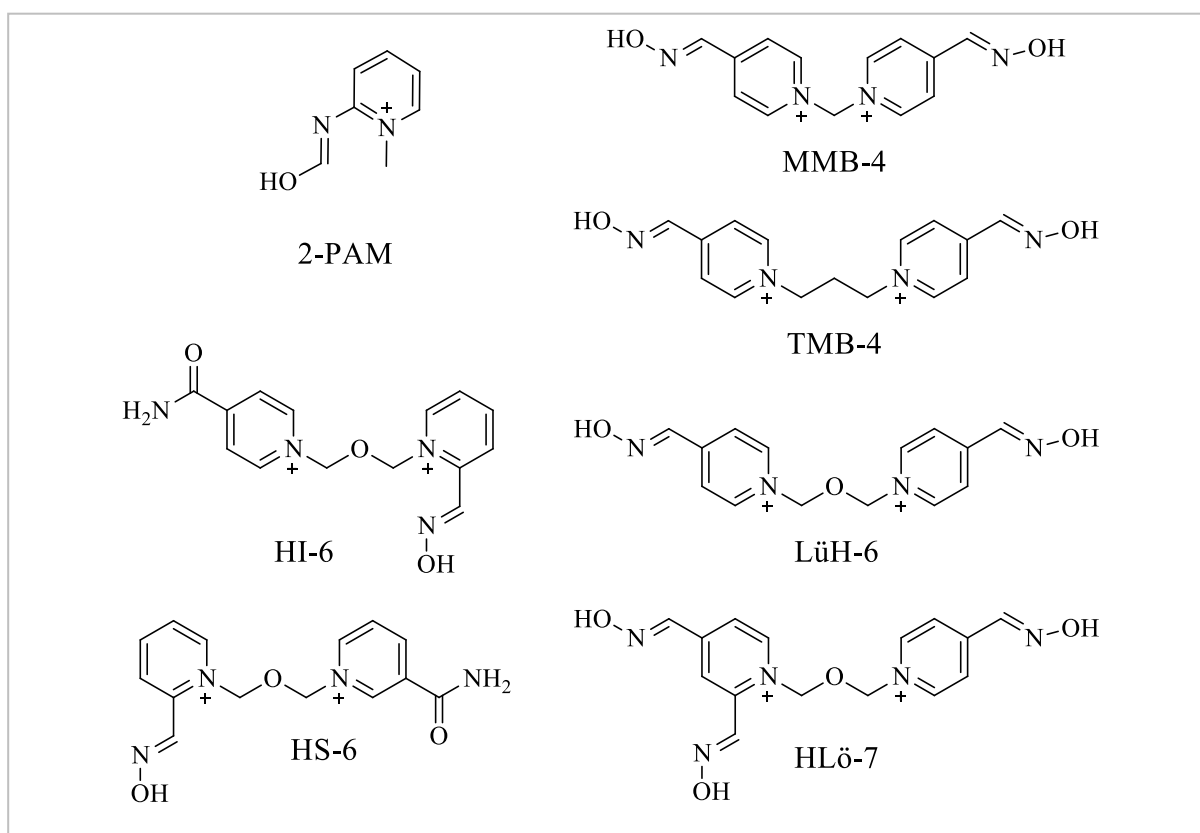
Slika 2.4. Kemijska struktura antimuskarinika atropina, benzodiazepina klordiazepoksida i diazepama i općenita struktura oksimskih spojeva (R i R₁ predstavljaju različite kemijske skupine).

2.2. Oksimi

2.2.1. Oksimi u medicinskoj praksi

Prvi reaktivator bio je pralidoksim (2-PAM)⁷⁵, piridinijev oksim analogan po strukturi ACh (**slika 2.5**). Sintetiziran je 1955. od kad koristi u medicinske svrhe kao protuotrov za otrovanja OP spojevima. Nedugo zatim, sintetizirani su prvi bispiridnijski bisoksimi trimedoksim (TMB-4) i metoksim (MMB4), koji su se razlikovali u duljini poveznice između dva piridinjeva prstena (**slika 2.5**)⁷⁶. Budući da su se ovi oksimi pokazali učinkovitima u reaktivaciji fosfilirane AChE inhibirane sarinom i VX-om, na osnovu njihove strukture je s ciljem učinkovitije i univerzalnije reaktivacije fosfilirane AChE sintetiziran cijeli niz novih bispiridinijevih oksima u laboratoriju Ilse Hagedorn: obidoksim (LüH-6), asoksim (HI-6), HS-6 i HLö-7 (**slika 2.5**)^{77,78}. HI-6 i LüH-6, od spomenutih bispiridinijevih oksima imali su zadovoljavajuću reaktivacijsku

učinkovitost fosfilirane AChE uz zanemarivu toksičnost te su odobreni i uvedeni kao novi protuotrovi za terapiju otrovanja 2000-ih⁷⁹.



Slika 2.5. Kemijska struktura prvih piridinijevih oksima.

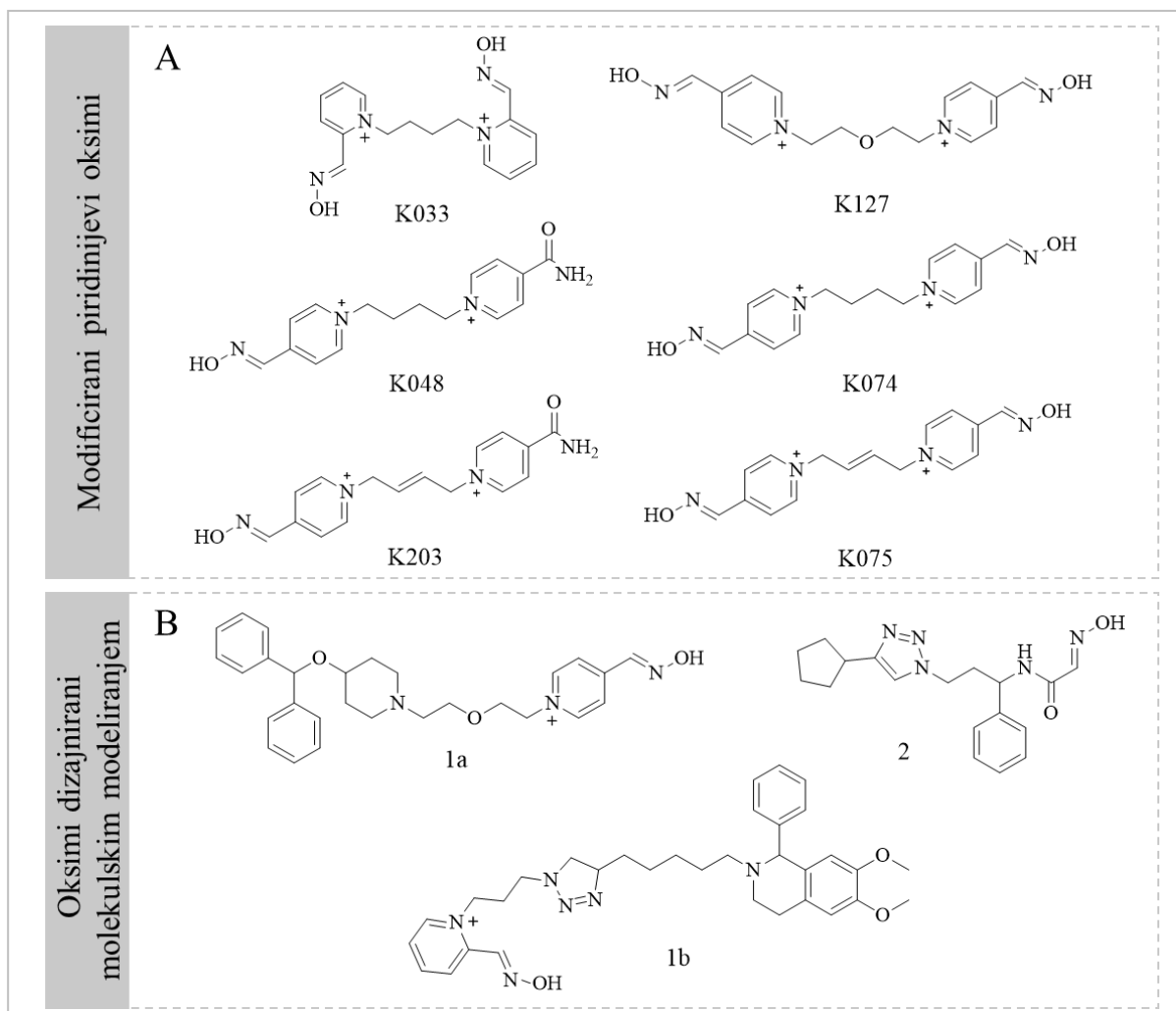
U praksi se danas koristi samo nekoliko oksima, svi piridinijevе strukture, ovisno o dostupnosti u pojedinoj zemlji: 2-PAM (SAD i Francuska), HI-6 (Kanada, Hrvatska, Švedska) i LüH-6 (Njemačka, Češka)⁸⁰. Oksimska učinkovitost u reaktivaciji fosfilirane AChE ovisi kako o strukturi samog oksima tako i o strukturi i fizikalno-kemijskim svojstvima vezane fosfilne skupine OP-a na aktivni serin. Tako je npr. 2-PAM relativno učinkovit u reaktivaciji fosfilirane AChE sarinom i VX-om, ali lošiji od ostalih oksima koji se koriste u praksi⁷⁹. LüH-6 je učinkovit u reaktivaciji AChE inhibirane OP pesticidima⁸¹ te tabunom, sarinom i VX-om⁷⁹. HI-6 je djelotvoran u reaktivaciji AChE inhibirane ciklosarinom, sarinom, VX-om i djelomično somanom^{79,82}. Ovo pokazuje da niti jedan od ovih oksima nije univerzalno učinkovit reaktivator za sve OP. Također, kolinergički simptomi središnjeg živčanog sustava su i dalje prisutni²⁸. Uz to, zbog prisutnosti pozitivnog naboja u strukturi, oksimi ovog tipa se brzo metaboliziraju i biotransformiraju enzimskim sustavom CYP450 te zatim eliminiraju putem mokraće^{83–85}. K tome, piridinijevi oksimi ne prolaze krvno-moždanu barijeru^{86,87} te ne djeluju na sinaptičku

AChE u mozgu. S obzirom da nisu aktivni u središnjem živčanom sustavu pristupilo se sintezi modificiranih piridinijevih oksima i oksima nepiridinijeve strukture^{25,88,89}.

2.2.2. *Modificirani piridinijevi i novosintetizirani nepiridinijevi oksimi*

U proteklih 40-ak godina sintetizirane su modificirane strukture HI-6 i HI-7, s različitim poveznicama između dva piridinijeva prstena (alkan, alken, ksilen, fenilen, itd.) i supstituentima na prstenu⁹⁰. Piridinijev oksim K033, s butanskom poveznicom, pokazao se jednako djelotvornim u reaktivaciji kao HI-6, dok su ostali piridinijevi oksimi, K048 i K074 (s butanskom poveznicom), K203 i K075 (but-2-enskom poveznicom) i K127 (s oksapentenskom poveznicom) (**slika 2.6.A**) bili učinkovitiji od LÜH-6 u reaktivaciji tabunom-inhibirane AChE⁹¹⁻⁹⁴.

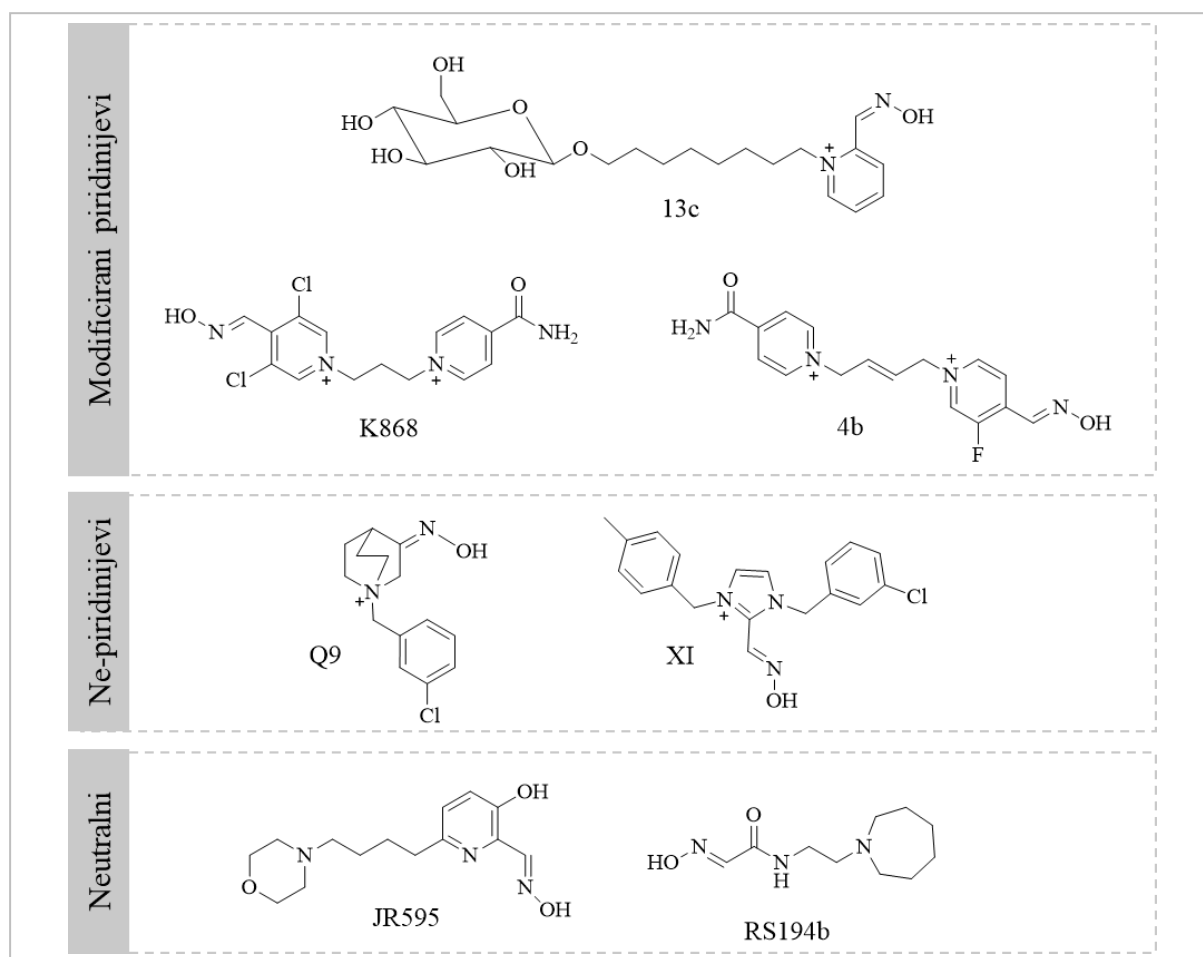
S ciljem poboljšanja afiniteta vezanja za AChE, oksimi se dizajniraju računalnim metodama molekulskog modeliranja prema karakteristikama aktivnog mjesta AChE i konformacijskim promjenama u aktivnom mjestu AChE koje nastaju vezanjem OP-a^{21,88,95}. Utvrđeno je da se dodatkom benzhidril-piperidinskog perifernog liganda s etilenglikolskom poveznicom u strukturu piridinijevog oksima (1a, **slika 2.6.B**) povećao afinitet te učinkovitost spoja u reaktivaciji fosfilirane AChE⁹⁵. Nadalje, oksimi s fenilhidroizokinolinskim motivom kao perifernim ligandom povezani na piridinijev prsten poveznicom unutar koje je triazolni prsten (oksim 1b, **slika 2.6.B**), rezultirali su visokim afinitetom AChE za takve spojeve, iako sa zanemarivom brzinom reaktivacije ciklosarinom-, sarinom- i VX-om inhibirane AChE usporedbi s 2-PAM-om i HI-6⁸⁸. K tome, detaljnijim proučavanjem dostupnih kristalnih struktura AChE, pokazalo se da je pored tzv. kolinskog i perifernog veznog mjesta moguće još jedno mjesto vezanja oksima²¹ te su sintetizirani *N*-supstituirani 2-hidroksiiminoacetamidi (oksim 2, **slika 2.6.B**), čiji ligandi ostvaruju interakcije i s dodatnom domenom aktivnog mjesta²¹. S obzirom da su ovi spojevi neutralni, imaju potencijal biti centralno aktivni reaktivatori.



Slika 2.6. Kemijska struktura A) modificiranih piridinijevih struktura i B) oksima dizajniranih računalnom metodom molekulskog modeliranja prema aktivnom mjestu AChE (1a – oksim s benzhidril-piperidinskim, 1b- fenilhidroizokinolinskim perifernim ligandom i 2 - *N*-supstituirani 2-hidroksiiminoacetamid).

Razvoj oksima također je usmjeren i na piridinijeve i nepiridinijeve oksime (**slika 2.7**) poboljšanih svojstava radi njihovog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru kako bi se omogućila reaktivacija inhibirane AChE u središnjem živčanom sustavu^{24,25,89}. Takva svojstva oksima pokušavaju se osigurati na nekoliko načina: strukturama koji nemaju kvaterni dušikov atom unutar piridinskog prstena²³, glikozilacijom oksima⁹⁶, zamjenom piridinijeva prstena imidazolijevim ili kinuklidinijevim^{25,89}, povećanjem lipofilnosti molekula reaktivatora različitim supstituentima^{24,97} i zwitterionskim strukturama koje istovremeno mogu imati oba ionska stanja u istoj molekuli⁹⁸. Na primjer, glikozilirani oksimi (oksim 13c, **slika 2.7**) lakše prolaze kroz krvno-moždanu barijeru od drugih oksima bez uzrokovanja promjene morfologije živčanih stanica, no s niskom učinkovitošću reaktivacije inhibirane AChE⁹⁶. Nadalje, promjena strukture prstena oksima, tj. zamjena piridinijskog prstena kinuklidinijevim ili

(benz)imidazolijskim (oksimi Q9 i XI, **slika 2.7**), smanjila je učinkovitost reaktivacije fosfilirane AChE u odnosu na HI-6 i LÜH-6, ali je doprinijela interakciji s acetilkolinskim receptorima, vaskularnim endotelnim faktorima rasta (VGFR), boljoj oralnoj bioraspoloživosti, inhibiciji sinteze kolesterola i antibakterijskom djelovanju prema nizu štetnih bakterijskih kultura^{25,89,99,100}. Također, dodatkom atoma klora na piridinijev prsten poboljšala se učinkovitost reaktivacije ciklosarinom, sarinom, VX-om i tabunom inhibirane AChE u odnosu na njihove piridinijeve analoge i HI-6²³. Dodatak klora u strukturu je očekivano snizio pK_a oksimske skupine pri fiziološkom pH, no to ipak nije doprinijelo boljem prolasku krvno-moždane barijere²⁴. Sintezom neutralnih spojeva ili zwitterionske strukture (oksimi JR595 i RS194B, **slika 2.7**) primijećen je efikasniji prolazak kroz krvno-moždanu barijeru te reaktivacija fosfilirane AChE²³, što je rezultiralo uključenjem jednog takvog spoja u fazu kliničkih ispitivanja (RS194B, **slika 2.7**)^{101–103}.



Slika 2.7. Kemijska struktura reaktivatora fosfilirane AChE iz skupine piridinijevih (13c - glikozilirani, K868 - piridinijev s klorom i 4b - piridinijev s fluorom) te ne-piridinijeve (Q9 - kinuklidinijev i XI - imidazolijski) i neutralnih (JR595 - bez naboja i RS194B - zwitterionski) oksima.

Iako se do danas sintetiziralo više stotina novih potencijalnih oksima s novim poželjnim karakteristikama, nijedan nije pokazao univerzalnost u reaktivaciji AChE fosfilirane različitim OP spojevima. Također, mnogi novi oksimi zbog neželjenih učinaka na druge biološke sustave ili enzime, ne zadovoljavaju kriterije sigurnosti i ne ulaze u daljnje faze razvoja protuotrova.

2.3. Razvoj novih protuotrova

2.3.1. Proces razvoja lijekova (protuotrova)

Razvoj novih lijekova/protuotrova je zahtjevan, dugotrajan i skup proces, što najbolje pokazuje ukupna vrijednost troškova razvoja i plasiranja na tržište jednog lijeka koja iznosi oko 2 milijarde dolara^{104,105}. Prije nego se lijek plasira na tržište, potrebno je ispuniti niz kriterija o sigurnosti lijeka te dobiti odobrenje nadležnog regulatornog tijela za lijekove i medicinske proizvode za navedeno tržište¹⁰⁶. Cjelokupni proces prije odobrenja lijeka podijeljen je u nekoliko faza, a započinje razvojem u laboratoriju (**slika 2.8**).

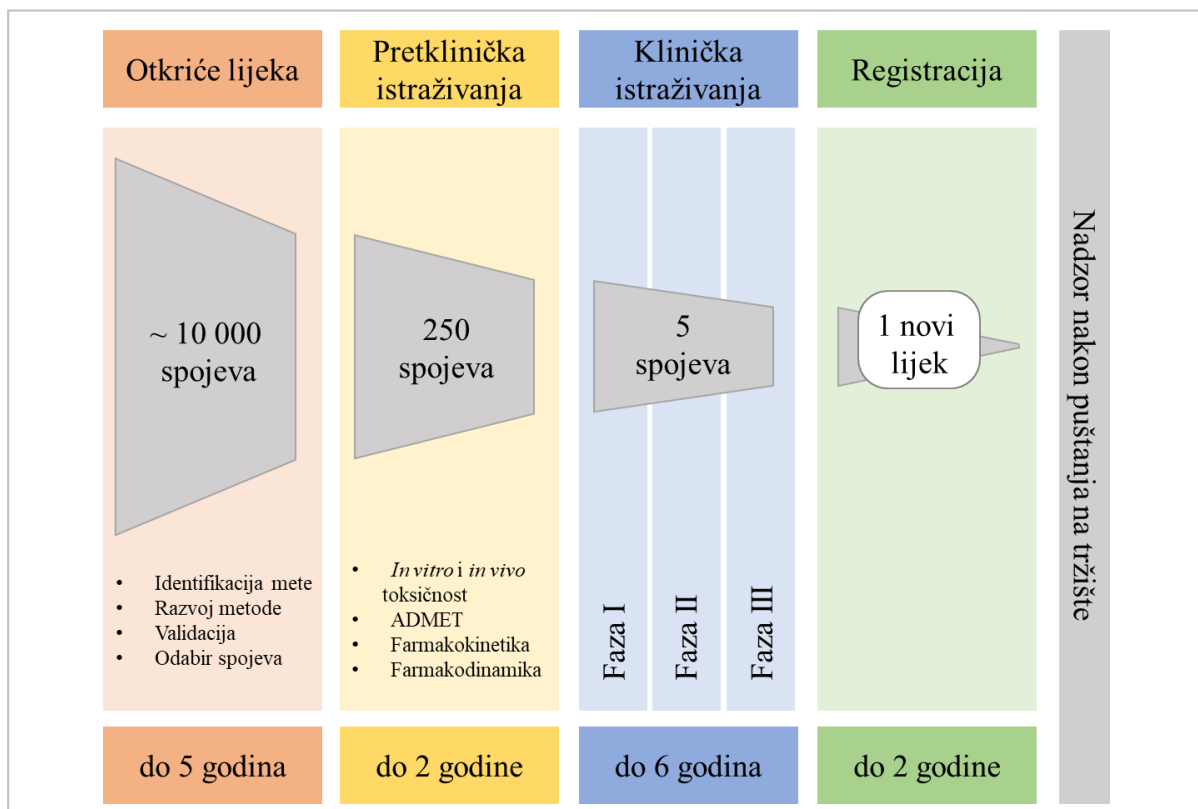
Faza otkrića potencijalnog lijeka obuhvaća identifikaciju mete, prikupljanje podataka za razumjevanje biološkog djelovanja potencijalnog lijeka, validaciju i razvoj metoda (detekcija, kvantifikacija, modeliranje itd.) te odabir vodećih spojeva za daljnja testiranja. Drugim riječima, spojevi se na osnovu biološke aktivnosti odabiru kao kandidati poželjnih karakteristika za razvoj budućeg lijeka¹⁰⁷.

Prije testiranja na ljudima, potencijalni lijek mora proći toksikološka testiranja u fazi pretkliničkog istraživanja koje je relativno kratko (1 – 2 godine) u usporedbi s ostalim fazama razvoja lijeka (**slika 2.8**). Tijekom pretkliničkog razvoja, u nekoliko se koraka ispituje toksičnost potencijalnih lijekova u *in vitro* (staničnim) i *in vivo* (životinjskim) sustavima¹⁰⁶. Proverom ADMET (engl. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity*) testira se njihova apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija iz organizma i toksičnost, čime se utvrđuje uzrokuje li potencijalni lijek neželjene učinke ili nespecifična djelovanja na druge mete u organizmu. Pretklinička testiranja obuhvaćaju i testiranja na životinjskim modelima, a model ovisi o sličnosti specifične mete od interesa s ljudskim sustavom, ali i o odobrenju Etičkog povjerenstva¹⁰⁸. Spojevi koji se pokažu djelotvornima i zadovoljavajućih karakteristika, postaju kandidati za kliničku fazu istraživanja, u kojoj ispitanici sudjeluju dobrovoljno^{106,109}.

Klinička faza je najdugotrajnija i najskuplja faza, a može trajati i do 7 godina. Podjelom kliničke faze na tri dijela (Fazu I, Fazu II i Fazu III; **slika 2.8**), osigurava se prikupljanje

dodatnih informacija o djelovanju potencijalnog lijeka, razvoju terapije, popratnim simptomima i nuspojavama te utjecaju na kvalitetu života ispitanika¹¹⁰. Faza I obuhvaća procjenu toksičnosti pri različitim dozama na malom broju ispitanika (od 20 do 100) kako bi se utvrdila točna farmakokinetika i doza lijeka pri kojoj dolazi do toksičnosti tj. provjerava se apsorpcija, raspodjela u organizmu, putevi i brzina izlučivanja (eliminacije) te najbolji način unosa u organizam: u venu (intravenski), u mišić (intramuskularno) ili pod kožu (subkutano)^{111–113}. U Fazi II ispituje se djelovanje potencijalnog lijeka na ciljanu metu odnosno djelovanje na ciljni poremećaj ili bolest uz određivanje optimalne doze za željeni učinak na skupini od nekoliko stotina ispitanika radi liječenja ili prevencije ciljnog poremećaja ili bolesti¹¹⁰. Faza III procjenjuje djelovanje potencijalnog lijeka na mješovitim skupinama od 300 do 3 000 ispitanika u više različitih kliničkih centara, kako bi se potvrdila pretpostavljena terapija te efikasnost i učinci koji nisu primijećeni u ranijim fazama istraživanja¹⁰⁸. U ovoj fazi se novi lijek uspoređuje s već odobrenim lijekovima te s placebo lijekom (tzv. „lažni lijek“) koji ne sadrži farmakološki aktivne komponente kao lijek^{106,110}.

Nakon što je prikupljeno dovoljno dokaza iz svih faza istraživanja da je lijek siguran i učinkovit za ljudsku uporabu, podnosi se zahtjev za registraciju lijeka i stavljanje na tržište. Nadležno regulatorno tijelo na osnovu podnesenih podataka donosi odluku o odobrenju registracije novog lijeka¹¹⁴. Procedura od početnog razvoja do registracije lijeka često može trajati i do 15 godina, pri čemu od 10 000 testiranih potencijalnih lijekova samo 1 dođe na tržište kao pravi lijek^{106,115}. Nakon registracije i stavljanja na tržište, prate se dugoročni učinci lijeka (**slika 2.8**): djelotvornost i sigurnost novog lijeka kod velikog broja bolesnika uz naglasak na određene skupine populacije (trudnice, djeca itd.), nuspojave te usporedba i/ili kombinacija s drugim dostupnim lijekovima¹¹⁶.



Slika 2.8. Vremenski okvir razvoja lijekova po fazama. Slika preuzeta iz reference¹⁰⁶ i prilagođena.

Prilikom razvoja oksima kao potencijalnih protuotrova za otrovanja OP-ima, također je potrebno zadovoljiti prethodno navedene kriterije sigurnosti i niske toksičnosti, no zbog karakterističnih svojstava i načina djelovanja OP-a i oksima, nailazi se na niz ograničenja i specifičnih zahtjeva u ranoj fazi ispitivanja toksičnosti¹¹⁷, o čemu će biti riječ u sljedećem poglavlju.

2.3.2. Ograničenja razvoja potencijalnih reaktivatora

Većina dosadašnjih ispitivanja oksima kao potencijalnih reaktivatora provodi se kinetičkim testovima *in vitro* prilikom kojih se prvenstveno određuje afinitet AChE za oksime tj. koncentracija koja inhibira aktivnost enzima^{23–25,93,118,119} i koncentracija koja je učinkovita u reaktivaciji AChE inhibirane različitim organofosfatima. Ove koncentracije predstavljaju relevantne koncentracije za primjenu u daljnjim eksperimentima evaluacije^{23,24,73,118,119}. Nakon određivanja kinetičkih parametara, dobiveni učinci *in vitro* većinom se potvrđuju, odnosno „vizualiziraju“ računalnim metodama molekulskog modeliranja ili se kristalizacijom kompleksa enzim – oksim pokušava potvrditi točno pozicioniranje oksima u aktivnom mjestu

fosfilirane AChE¹²⁰. U konačnici se na osnovu svih tih parametara odabiru kandidati koji zadovoljavaju kriterije za daljnja istraživanja.

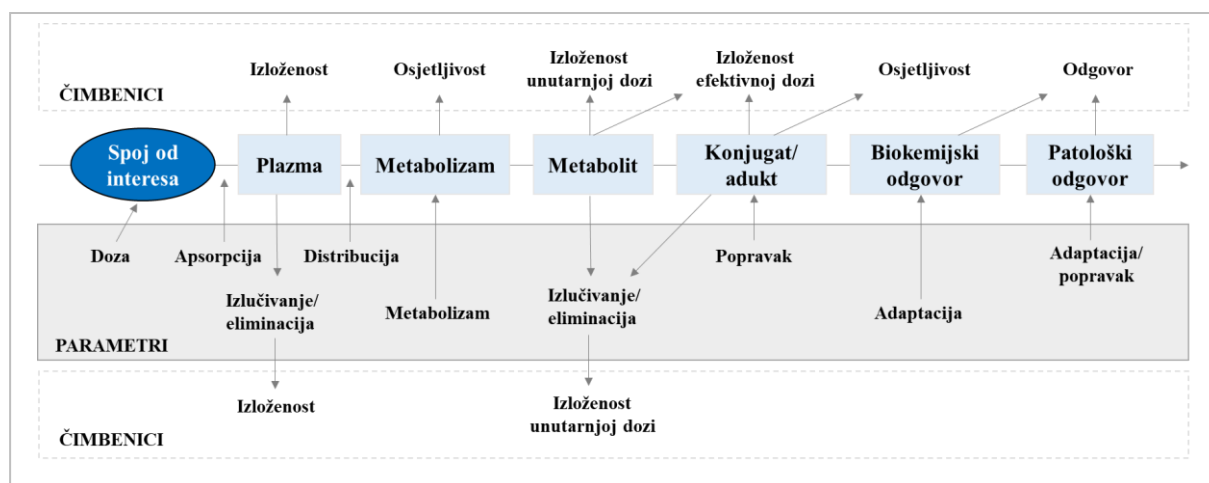
Nakon odabira, u pravilu se vodeći kandidati dalje ispituju *in vivo* testiranjima na životinjskim modelima, pretežito bez provedbe staničnih testova i procjene toksičnosti na razini stanice^{13,14}. Toksični utjecaj oksima na organe utvrdio je već 1956. godine Askew, koji je dokazao da oksimi mogu biti uzrok otrovanja popraćeni letargijom, tremorima i grčevima mišića te gubitkom refleksa nakon 15 minuta od aplikacije¹²¹. Isto tako, prethodno spomenuti piridinijev oksim K033, koji je u *in vitro* kinetičkim ispitivanjima zadovoljio parametre potencijalnog reaktivatora, u *in vivo* testiranjima je bio najtoksičniji testirani spoj iz testirane piridinijeve serije i izostavljen je iz daljnjih istraživanja¹²². Detaljnijim proučavanjem akutne i kronične toksičnosti piridinijevih oksima 2-PAM i TMB-4 zabilježene su fiziološke smetnje koje su ograničavale količinu i tip oksima koji se može primijeniti¹²³. Tako je primjena visokih doza 2-PAM uzrokovala blage probavne smetnje i glavobolje nekih ispitanika, dok je TMB-4, uz probavne smetnje, uzrokovao i osjećaj nervoze i nelagode, osip, žuticu i različite simptome središnjeg živčanog sustava, što je dovelo do njegove ograničene upotrebe¹²³. Uz to, Jačević i suradnici su 2019. ukazali na potencijalni citotoksični učinak oksima na vlakna koštanih mišića, odnosno na njihov doprinos patologiji toksičnih ozljeda koje se mogu manifestirati kao nekroza i/ili upala¹⁸.

Dodatan problem predstavlja i klasifikacija oksima, protuotrova otrovanja organofosfatima, u skupinu takozvanih „orphan“ lijekova (engl. *siročće*), farmaceutika za liječenje zdravstvenih stanja koja su toliko rijetka da ih bez potpore državne vlasti ne bi bilo isplativo proizvoditi¹²⁴. Uslijed toga su čak i predklinička ispitivanja na životinjskim modelima ograničena zbog već spomenutih etičkih pitanja i 3R koncepta te sigurnosnih propisa za rad, a zbog istih regulativa, nemoguće je testirati oksime na ljudima, osim u slučaju pacijenata koji u kliniku pristignu otrovani organofosfatima^{125,126}.

Stoga stanični testovi toksičnosti *in vitro* omogućuju istražiti izravne učinke oksima na molekularnoj razini, a koji dovode do patofiziološkog stanja organizma uslijed otrovanja organofosfatima, kao i podaci o djelovanju oksima izvan okvira prvotnih meta i mogućnost njihove primjene i u druge svrhe^{127,128}.

2.3.3. Ispitivanja toksičnosti spojeva

Čimbenici poput izloženosti, odgovora i osjetljivosti organizma na toksičan spoj od interesa, omogućuju određivanje njegove toksičnosti različitim parametrima koji osim doze uključuju njegovu apsorpciju, izlučivanje (eliminaciju), distribuciju i metabolizam (**slika 2.9**)¹²⁹. U organizmu se izloženost određuje koncentracijom spoja u plazmi, jer se iz plazme spoj dalje distribuira u ostala tkiva i stanice¹²⁹. Ovisno o mjestu distribucije, spojevi prolaze kroz proces metaboličke razgradnje, zbog čega sam metabolizam može biti uzrok toksičnosti¹³⁰. Naime, metaboliziranjem se mijenja struktura spoja, koji postaje reaktivan i stupa u interakcije s proteinima i nukleinskim kiselinama rezultirajući nastankom toksičnih konjugata ili adukata koji se mogu nagomilati i uzrokovati toksičnost^{130,131}. Biološki sustavi mogu imati različite biokemijske, fiziološke i patološke odgovore na izloženost toksičnom spoju, a većinom su to promjene strukture i funkcije proteina poput indukcije stresnih proteina, povećane ili smanjene aktivnosti određenih enzima. Odnos izloženosti spoju, osjetljivosti na spoj i odgovoru stanice ili organizma, zajednički čine model toksičnosti (**slika 2.9**). Praćenje specifičnih parametara omogućuje lakše povezivanje utjecaja toksičnog spoja i odgovora biološkog sustava na djelovanja spoja¹³².



Slika 2.9. Model toksičnosti uz odnos parametara i različitih čimbenika toksičnosti. Slika preuzeta iz reference¹³² i prilagođena.

Porast svijesti o upotrebi životinja u *in vivo* istraživanjima, preusmjerilo je testiranje toksičnosti na *in vitro* sustave. Trenutno načelo za etičko korištenje životinja u ispitivanjima temelji se na objedinjenom konceptu 3R: zamjena (engl. *replacement*), smanjenje (engl. *reduction*) i poboljšanje (engl. *refinement*)¹³³. Tako, ako je moguće, životinje treba zamjeniti alterantivnim

modelima poput staničnih linija, no ako nije moguće, mjerenja se trebaju prilagoditi i smanjiti broj korištenih životinja¹³⁴. K tome, *in vitro* sustavi omogućuju određivanje toksičnosti nekog spoja praćenjem specifičnih biokemijskih promjena, metaboličke aktivnosti, vijabilnosti, oštećenja membrane i sinteze određenih staničnih proteina^{135–137}. Dobar primjer uspješnog *in vitro* sustava za testiranje genotoksičnosti spojeva je takozvani Ames test pomoću bakterije *Salmonella typhimurium*¹³⁸ ili korištenje ljudskih stanica limfocita za detekciju oštećenja kromosoma¹³⁹ nakon izloženosti nekom agensu. Iako se *in vitro* i *in vivo* sustav mogu razlikovati i kvantitativno i kvalitativno, iscrpnim i detaljnim testovima toksičnosti *in vitro*, prema modelu prikazanim na **slici 2.9** mogu se obuhvatiti svi aspekti djelovanja spoja na razini stanice te približiti prirodnom *in vivo* modelnom sustavu¹³². Primjena testova baziranih na stanicama od izrazite je važnosti pri evaluaciji svih potencijalnih molekula u pretkliničkom procesu razvoja lijeka^{140,141}.

2.3.4. Primjena stanični testova u razvoju novih protuotrova

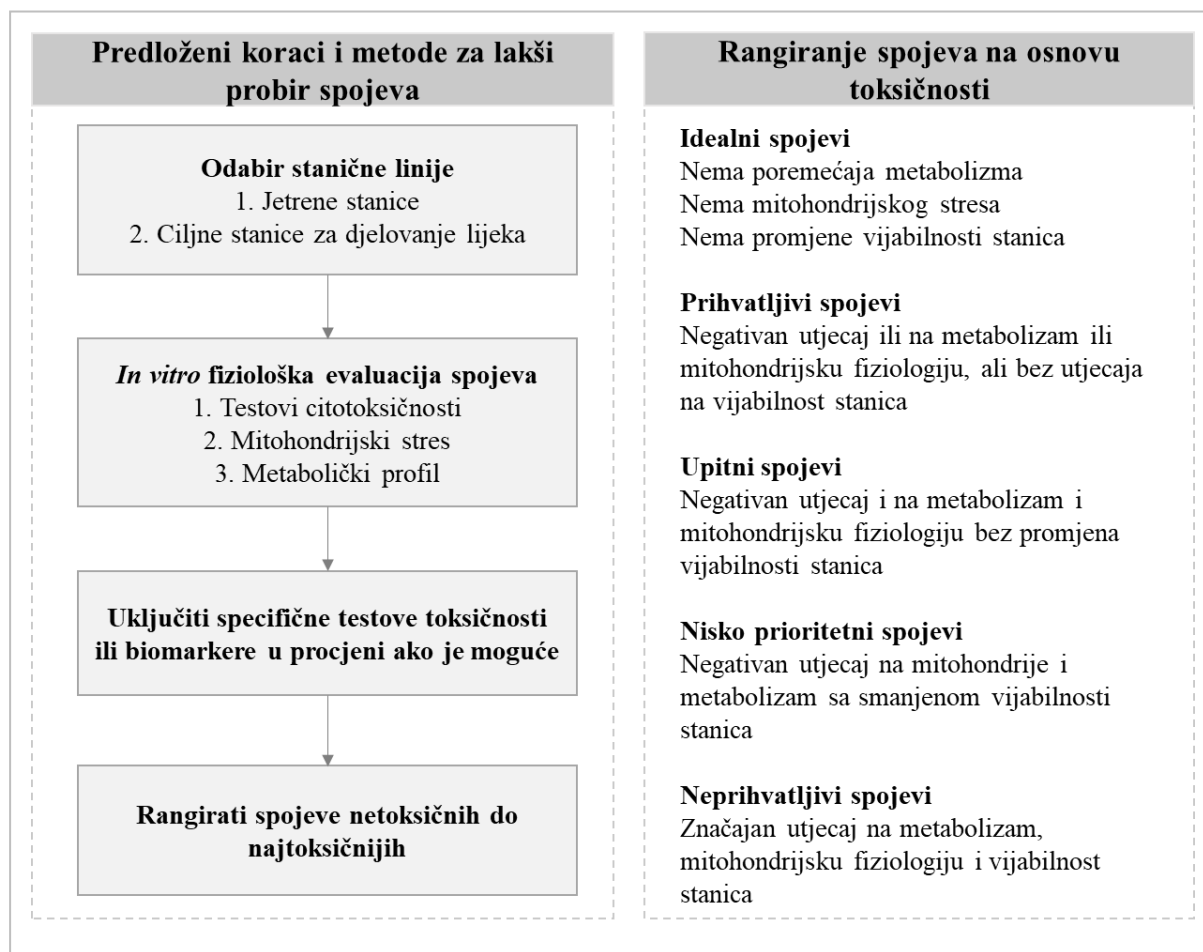
Osim što se staničnim testovima mogu se znatno smanjiti troškovi pri razvoju lijeka, prednost takvog pristupa evaluaciji potencijalnih lijekova je dostupnost mnogobrojnih staničnih kultura koje je lako uzgojiti u laboratorijskim uvjetima. Uzgajati ljudske stanice je postalo moguće tek sredinom 20. stoljeća zahvaljujući staničnom biologu George Geyu koji je uspješno izolirao stanice adenokarcinoma iz uzorka biopsije pacijentice Henriette Lacks i probao ih uzgojiti u valjkastim bocama¹⁴². Suprotno dotadašnjim rezultatima, ove stanice u kulturi normalno su rasle i tako postale prve ljudske stanice uzgojene u laboratorijskoj kulturi¹⁴³. Razvojem staničnih linija omogućeno je npr. istraživanje rijetkih bolesti, proučavanje staničnih mehanizama, starenja i raznih drugih stanja^{144–146}. Uz to, dostupnošću posebnih medija za uzgoj stanica u kulturi, dodataka za učinkovitiji stanični rast i adekvatne opreme, olakšan je pristup i rad u staničnom laboratoriju¹⁴⁷. Napredovanjem molekularne i stanične biologije, danas se primjenjuju i ko-kulture, 3D kulture i organoidi koji predstavljaju još učinkovitiji *in vitro* sustav za procjenu utjecaja novih lijekova na organizam, ponajprije ljudski^{148–150}. Time su se stvorili uvjeti za dobivanje ključnih povratnih informacija o djelovanju novih molekula, poput oksima, na staničnoj i molekularnoj razini.

Dosadašnja istraživanja toksičnosti oksima koja su uključivala stanice ukazuju na povezanost njihove strukture i citotoksičnosti. Naime, serije (benz)imidazolijskih spojeva

pokazale su obećavajuća svojstva u reaktivaciji fosfilirane AChE *in vitro*, ipak, većina kandidata, odabranih na temelju kinetičkih parametara, uzrokovala je smrt stanice i veću citotoksičnost nego medicinski odobreni oksimi²⁵. Uočeno je da citotoksičnost ovisi i o vrsti tretiranih stanica (HepG2 ili THP-1) kao i o specifičnim strukturnim motivima spojeva²⁵. Tako je pokazano da se npr. citotoksičnost bispiridinijskih oksimskih reaktivatora mijenja ovisno o kemijskoj strukturi poveznice između dva prstena¹⁵¹. Spojevi s poveznicom duljine C1–C2 (MMB-4) ili dvostrukom vezom unutar poveznice (K075) bili su vrlo toksični. Ipak, važno je napomenuti da je citotoksičnost primijećena pri koncentracijama znatno višim nego što je njihova primjena u terapiji trovanja organofosfatima, što ih i dalje čini pogodnima za razvoj kao lijeka odnosno protuotrova kod trovanja OP spojevima^{151,152}. Dodatnim testovima provjere oksidacijskog statusa stanice tijekom izloženosti piridinijskim oksimima, potvrđeno je da su bispiridinijski oksimi s oksimskom skupinom na poziciji 4 na piridinijskom prstenu podložniji indukciji reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, dok medicinski odobreni oksimi 2-PAM i HI-6 nisu¹⁵³. Naime, smrt stanice je krajnji ishod djelovanja i obično se detektira pri višim koncentracijama spoja kojem se stanice izlažu unutar 24 sata. Zbog toga je potrebno dodatnim testovima detaljnije utvrditi učinke oksima na razini stanica kako bi se utvrdio točan mehanizam toksičnosti prije probira onih koji će se odabrati za daljnja *in vivo* istraživanja. Praćenjem kombinacije mitohondrijskog stresa, metabolizma, vijabilnosti stanica i aktivacije apoptoze uočena je pouzdana korelacija toksičnosti *in vitro* s učincima *in vivo* što je doprinijelo potvrđivanju jednog kandidata za siguran daljnji razvoj protuotrova organofosfata¹⁵⁴.

Iako je nemoguće sa sigurnošću prije kliničkih ispitivanja utvrditi hoće li potencijalan lijek ili protuotrov biti siguran za upotrebu, važno je poboljšati *in vitro* pretklinički razvoj kako bi se smanjio rizik za životinje ili pojedince koji sudjeluju u kasnijim kliničkim ispitivanjima. Kao što je već spomenuto, provjera toksičnosti na razini stanica u pretkliničkoj fazi, početni je korak probira potencijalnih kandidata za daljnji razvoj protuotrova. Korištenje objedinjenog pristupa testiranja citotoksičnosti u kombinaciji s dodatnim tehnikama toksikologije *in vitro* može se poboljšati predviđanje utjecaja i oksima na sustav prije *in vivo* istraživanja¹⁵⁴. Stoga se sve više iskazuje potreba za učinkovitim i funkcionalnim povezivanjem citotoksičnosti *in vitro* s određivanjem točnog mehanizma toksičnosti s ciljem sprječavanja nepredviđenih toksičnih učinaka u *in vivo* ispitivanjima^{12,18,85,122,154}. Shodno tome, na **slici 2.10** prikazane su preporuke kako uspješno odrediti toksični profil spoja od interesa. Spojevi koji pokazuju mali ili nikakav utjecaj na metabolizam, mitohondrijsku fiziologiju i vijabilnost te zadovoljavaju parametre

ostalnih specifičnih staničnih testova, trebali bi biti glavni kandidati za *in vivo* istraživanja tj. daljnji razvoj protuotrova trovanja organofosfatima¹⁵⁴. Isto tako, spojeve sa suprotnim učincima od poželjnih na razini stanice potrebno je isključiti iz istraživanja razvoja protuotrova^{85,122,154}. Kao što je već spomenuto, na ovaj način može se smanjiti broj toksičnih spojeva uključenih u pretklinička ispitivanja i time smanjiti troškove i broj korištenih laboratorijskih životinja.



Slika 2.10. Shematski prikaz predloženih koraka pri ispitivanju toksičnosti *in vitro* na razini stanica. Slika preuzeta iz reference ¹⁵⁴ i prilagođena.

Ukratko, svaka stanična metoda ima svoje doprinose evaluaciji oksima kao potencijalnih protuotrova, kao i nedostatke. Međutim upotreba objedinjenog pristupa pomoću više različitih staničnih testova, može doprinijeti boljoj procjeni mehanizma toksičnosti, odnosno nadomjestiti nedostatke i manjkavost informacija ¹⁴⁰. Danas postoje razni stanični testovi koje se odabiru ovisno o informacijama koje želimo pomoću njih saznati. Testovi se baziraju na upotrebi različitih reagensa koji se metaboliziraju pomoću specifičnih enzima

stanice (prisutnih unutar ili izvan stanice) u produkt čija se prisutnost detektira na osnovi njegovog specifičnog svojstva npr. absorbancije, fluorescencije ili luminiscencije. Jačina signala proporcionalna je aktivnosti enzima koji opisuje praćeni učinak spoja na stanicu. U **tablici 2.1** nalazi se nekoliko metoda korištenih prilikom izrade ove disertacije.

Tablica 2.1. Popis odabranih staničnih testova i njihova upotreba.

Metoda	Reagens ili model	Način detekcije produkta	Upotreba	Opis
MTS test	MTS	absorbancija	Vijabilnost stanica Citotoksičnost spojeva	Utjecaj spojeva na staničnu vijabilnost praćenjem aktivnosti mitohondrijske sukinat dehidrogenaze u metaboličkim aktivnim stanicama
LDH test	resazurin	fluorescencija	Vijabilnost stanica Integritet membrane	Uslijed pucanja membrane laktat dehidrogenaza (LDH) ispušta se iz stanice u okolni medij te se prati njena aktivnost izvan stanice koja je indikacija promjene integriteta membrane i neregulirane stanične smrti
ROS test	DCFDA	fluorescencija	Indukcija reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) Oksidacijski stres stanice	Utjecaj spojeva na indukciju ROS-ova u stanici praćenjem oksidacije reagensa H ₂ DCF u njihovom prisustvu
GSH test	MCB	fluorescencija	Redukcija glutationa (GSH) Antioksidacijski status stanice	Neposredno praćenje potrošnje GSH koji se u obliku MCB-GSH adukta pumpa izvan stanice gdje se određuje njegova prisutnost, kao odgovor na stanični stres
Mitohondrijski test	TMRE	fluorescencija	Mitohondrijski membranski potencijal Indikacija oštećenja mitohondrija	Uslijed promjene membranskog potencijala, zbog oštećenja mitohondrija, mijenja se akumulacija reagensa TMRE i time jačina signala koji se detektira
Apoptoza test	Annexin V i 7-AAD	fluorescencija	Aktivacija procesa apoptoze	Prati se indukcija markera apoptoze vezanjem specifičnih protutijela koji ujedno ukazuju i na pojedinu fazu apoptoze
Aktivnost kaspaza	DEVD-ProRed IETD-R110 LEHD-AMC	fluorescencija	Aktivacija specifičnih kaspaza	Prati se aktivacija i aktivnost specifičnih enzima uključenih u proces apoptoze (određuje se i način aktivacije - vanjskim ili unutarnjim signalnim putem)
Oštećenje DNA	ATM i H2A.X	fluorescencija	Indukcija oštećenja molekula DNA Nastanak dvolančanih lomova	Nastanak dvolančanih lomova prati se specifičnim protutijelom za aktivne oblike proteina ATM i H2A.X kao ukupne mjere oštećenja molekule DNA

Aktivacija signalnih putova	NF- κ B, MAPK, STAT3, ERK1/2, ACC	kemiluminiscencija	Aktivacija određenih signalnih putova fosforilacijom specifičnih proteina	Metodom se prati promjena fosforilacije specifičnih proteina određenih signalnih putova koji ukazuju na njihovu aktivaciju te prijenos signala u stanici, a temelji se na vezanju specifičnih protutijela na protein od interesa u uzorku
Test permeabilnosti membrane	MDCKII-MDR1 stanice	kromatografija	Pasivni transporta kroz biološke membrane	Prati se pasivni prolaska spojeva kroz membranu u vidu jednoslojne kulture MDCKII-MDR1-a te se određuje i posreduju li P-glikoprotein pumpe u njihovoj translokacija kroz istu. Koncentracija spoja koji je prošao određuje se jednom od kromatografskih metoda (npr. HPLC, LC-MS)
Test metaboličke stabilnosti	mikrosomi	kromatografija	Metabolička stabilnost spojeva	Određuje se razgradnja odnosno metabolizam spojeva u prisutnosti jetrenih metaboličkih enzima te se testirani spoj i njegovi produkti kvantificiraju kromatografskim metodama kako bi se odredilo poluvrijeme metaboličke razgradnje spoja

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije, materijali i ostalo

3.1.1. Kemikalije, otapala, otopine i reagensi

Za pripremu pufera korišteni su abecednim redom navedeni: β -merkaptetoetanol (*Sigma Aldrich*, Njemačka), bromfenol plavo (*Sigma Aldrich*, Njemačka), dinatrijev hidrogen fosfat (Na_2HPO_4 , *Kemika*, Zagreb), dinatrijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline dihidrat (EDTA, *Sigma Aldrich*, Njemačka), fenilmetansulfonil fluorid (PMSF, *Sigma Aldrich*, Njemačka), glicin (*Sigma Aldrich*, Njemačka), kalcijev klorid (CaCl_2 , *Kemika*, Zagreb), kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4 , *Kemika*, Zagreb), kalijev klorid (KCl, *Kemika*, Zagreb), natrijev dodecil sulfat (SDS, *Sigma Aldrich*, Njemačka), natrijev fluorid (NAF, *Sigma Aldrich*, Njemačka), natrijev klorid (NaCl, *Kemika*, Zagreb), natrijev ortovanadat (Na_3VO_4 , *Sigma Aldrich*, Njemačka), magnezijev klorid (MgCl_2 , *Kemika*, Zagreb), Tween® 20 (*Sigma Aldrich*, Njemačka), Trizma® baza (Tris, *Sigma Aldrich*, Njemačka) i Tropix® I-BLOCK™ (*Thermo Fisher Scientific*, SAD)

Klorovodična kiselina (36,5 % (v/v) HCl, *Kemika*, Zagreb) je korištena za pripremu vodene otopine 1 mol dm^{-3} , koja je korištena za podešavanje pH vrijednosti pufera.

Octena kiselina (99,5 % (v/v) HOAc, *Kemika*, Zagreb) je korištena za pripremu 5 %-tne vodene otopine (v/v) koja je korištena za pripremu Ponceau S bojila i predinkubaciju membrana za *western blot*.

Dimetil-sulfoksid (99 % (v/v) DMSO, *Kemika*, Zagreb) korišten je za pripremu otopina oksima. Konačni postotak DMSO-a u pokusima bio je od 0,001 do 0,8 % (v/v) i utjecaj na rast stanica i aktivnost određivanih staničnih meta bio je zanemariv.

Metanol (99,8 % (v/v) MeOH, *Kemika*, Zagreb) korišten je za pripremu otopina oksima. Konačni postotak MeOH u pokusima bio je od 0,009 do 0,5 % (v/v) i utjecaj na rast stanica i aktivnost određivanih staničnih meta bio je zanemariv.

Glicerol (*Sigma Aldrich*, Njemačka) korišten je za pripremu 75 %-tne vodene otopine (v/v), koja je korištena za pripremu homogenizacijskog pufera.

Triton X-100 (*Sigma Aldrich*, Njemačka) korišten je kao sredstvo za permeabilizaciju stanične membrane u koncentraciji od 0,18 % (v/v) te za pripremu 20 %-tne vodene otopine (v/v), koja je korištena za pripremu homogenizacijskog pufera.

Vodikov peroksid (30 % (v/v) H_2O_2 , *Kemika*, Zagreb) korišten je kao pozitivna kontrola za određivanje indukcije reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama. Otopina koncentracije 100 mmol dm^{-3} pripremljena je razrjeđivanjem u destiliranoj vodi i čuvana na 4°C .

Tert-butilvodikov peroksid (70 % (v/v) tBOOH, *ACROS Organics*TM, SAD) korišten je kao pozitivna kontrola za određivanje antioksidacijskog statusa stanice. Otopina koncentracije 100 mmol dm^{-3} pripremljena je razrjeđivanjem u destiliranoj vodi i čuvana na 4°C .

Paraformaldehid (4 % (v/v), *Sigma Aldrich*, Njemačka) korišten je kao pozitivna kontrola određivanje aktivacije procesa regulirane smrti stanice.

Natrijev dodecilsulfat (SDS) korišten je kao 10 %-tne vodene otopine, za pripremu transfer pufera.

Atrakurijev besilat (98 % AB, *Sigma-Aldrich*, Njemačka) korišten je kao kontrolni spoj poznatog djelovanja pri testiranju citotoksičnosti u 24 h. Izvorna otopina koncentracije 10 mmol dm^{-3} pripremljena je otapanjem u destiliranoj vodi i čuvana na 4°C .

Atropin (At, *Sigma-Aldrich*, Njemačka) korišten je kao kontrolni spoj poznatog djelovanja pri testiranju citotoksičnosti u 24 sata. Izvorna otopina koncentracije 100 mmol dm^{-3} pripremljena je otapanjem u destiliranoj vodi i čuvana na 4°C .

Acetilkinolin (99 % ACh, *Sigma-Aldrich*, Njemačka) korišten je kao kontrolni spoj poznatog djelovanja pri testiranju citotoksičnosti u 24 h. Izvorna otopina koncentracije 10 mmol dm^{-3} pripremljena je otapanjem u destiliranoj vodi neposredno prije eksperimenta.

Staurosporin (otopina 1 mmol dm^{-3} u DMSO SS, *Abcam*, Ujedinjeno Kraljevstvo) korišten je kao kontrolni spoj poznatog djelovanja pri testiranju citotoksičnosti, apoptoze i aktivacije specifičnih kaspaza. Izvorna otopina koncentracije 1 mmol dm^{-3} u DMSO čuvana je na 4°C .

Karbonilcijanid-3-klorofenilhidrazon (otopina 50 mmol dm^{-3} u DMSO CCCP, *Cell Signaling Technology Europe*, Nizozemska) korišten je kao pozitivna kontrola za depolarizaciju mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) stanica. Izvorna otopina koncentracije 50 mmol dm^{-3} u DMSO čuvana je na -20°C .

Etopozid (98 %, *Sigma Aldrich*, Njemačka) korišten je kao pozitivna kontrola za određivanje oštećenja molekule DNA. Izvorna otopina koncentracije 1 mmol dm^{-3} pripremljena je u DMSO i čuvana na -20°C .

Elacridar (98 %, *International Laboratory*, SAD) korišten je kao inhibitor P-glikoprotein pumpi za određivanje mogućnosti prolaska spojeva kroz biološke membrane. Izvorna otopina koncentracije 2 mg mL^{-1} u DMSO čuvana je na 4°C .

Amprenavir (98 %, *AK Scientific Inc.*, SAD) korišten je kao pozitivna kontrola za određivanje mogućnosti prolaska spojeva kroz biološke membrane. Izvorna otopina koncentracije 2 mg mL^{-1} u DMSO čuvana je na 4°C .

Diklofenak (*Sigma Aldrich*, Njemačka) korišten je kao pozitivna kontrola za određivanje mogućnosti prolaska spojeva kroz biološke membrane. Izvorna otopina koncentracije 20 mg mL^{-1} u DMSO čuvana je na 4°C .

Reagens 2',7'-diklorofluorescein-diacetat (DCFDA, *Sigma Aldrich*, Njemačka) je korišten za određivanje indukcije reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama. Izvorna otopina 10 mmol dm^{-3} pripremljena je otapanjem u DMSO-u, i čuvana na -20°C zaštićena od svjetla.

Otopina boje tripan plavo (0,4 % (v/v), *Sigma Aldrich*, Njemačka) korištena je za određivanje broja živih i broja mrtvih stanica.

Reagens monoklorobiman (MCB, *Sigma Aldrich*, Njemačka) korišten je za određivanje antioksidacijskog statusa stanice. Izvorna otopina koncentracije 5 mmol dm^{-3} pripremljena je otapanjem u DMSO-u, i čuvana na -20°C zaštićena od svjetla.

Reagens etilni ester tetrametilrodamin perklorata (TMRE, *Cell Signaling Technology*, Nizozemska) korišten je za određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) stanica. Izvorna otopina koncentracije 1 mmol dm^{-3} pripremljena je u DMSO i čuvana na -20°C zaštićena od svjetla.

Reagens fenazin metosulfat (PMS, *ACROS Organics*TM, SAD) korišten je za pripremu otopine za određivanje vijabilnosti stanica. Izvorna otopina $0,92 \text{ mg dm}^{-3}$ pripremljena je u fosfatnom (PBS) puferu i čuvana na -20°C zaštićena od svjetla.

Reagens 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol (MTS, *Promega*, SAD) korišten je za pripremu otopine za određivanje vijabilnosti stanica. Izvorna otopina koncentracije 2 mg dm^{-3} pripremljena je u fosfatnom (PBS) puferu i čuvana na -20°C zaštićena od svjetla.

Reagens Ponceau S (*Sigma Aldrich*, Njemačka) pripremljen je otapanjem $0,033 \text{ g}$ u 30 mL destilirane vode i $0,3 \text{ mL}$ 5 %-tne octene kiseline (v/v) i čuvan na 4°C zaštićen od svjetla. Otopina je korištena za bojanje proteinskih vrpca na membranama.

Za određivanje učinaka testiranih spojeva na razini stanica korišteni su i komercijalno dostupni kitovi: *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit* (Promega, SAD) za određivanje vijabilnosti stanica; *CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay Kit* (Promega, SAD) za određivanje integriteta membrane; *Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (II)* (Cell Signaling Technology Europe, Nizozemska) za određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) stanica; *Annexin V Assay Kit* (Merck KGaA, Njemačka) za određivanje aktivacije procesa regulirane smrti stanice, *Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 Multiplex Activity Assay Kit* (Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo) za određivanje aktivacije specifičnih enzima kaspaza i *Muse® Multi-Color DNA Damage Kit* (Merck KGaA, Njemačka) za određivanje oštećenja molekule DNA.

Za razdvajanje proteina gel elektroforezom korišteni su komercijalni gelovi Criterion™ XT Bis-Tris Protein Gels 4 – 12 % Bis-Tris (BioRad, SAD).

3.1.2. Reagensi za western blot analize

Za određivanje i analizu ciljnih staničnih meta *western blot* tehnikom korištena su primarna protutijela proizvedena u kuniću (**tablica 3.1**), sekundarno kozje protutijelo protiv kunićjeg imunoglobulina klase G (IgG) obilježeno enzimom peroksidazom iz hrena (Bio Rad, SAD) te standard proteina poznate veličine tzv. marker *Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker – Full Range* (Sigma Aldrich, Njemačka).

Tablica 3.1. Primarna protutijela korištena u ovom radu.

Protutijelo	Proizvedeno	Razrjeđenje	Proizvođač
anti-p-ACC	Kunić	1:1000	Cell Signaling Techonolgy Inc., SAD
anti p-ERK	Kunić	1:10000	Cell Signaling Techonolgy Inc., SAD
anti pNFκB p65	Kunić monoklonsko	1:2000	Cell Signaling Techonolgy Inc., SAD
anti p-p38 MAPK	Kunić monoklonsko	1:1000	Cell Signaling Techonolgy Inc., SAD
anti p-STAT3	Kunić monoklonsko	1:1000	Cell Signaling Techonolgy Inc., SAD

3.1.3. Puferi

U pokusima sa stanicama korišten je fosfatni pufer (PBS, pH 7,4) koji je pripremljen kao deset puta veća koncentrirana otopina otapanjem 80,1 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ i 2,7 g KH₂PO₄ u 800 mL deionizirane vode. pH je podešen na 7,4 otopinom HCl (1 mol dm⁻³) te

nadopunjeno do 1 L. Pufer je autoklaviran i čuvan u sterilnim uvjetima do korištenja. Prije korištenja pripremljena je otopina PBS-a razrjeđenjem sterilnom deioniziranom vodom.

Tris pufer (TBS) pripremljen je kao koncentrirana otopina dvadeset puta veće koncentracije otapanjem 48,8 g Trizma® baze i 160 g NaCl u 800 mL destilirane vode. pH je podešen na 7,6 otopinom HCl (1 mol dm^{-3}) te nadopunjeno do 1 L.

TBST pufer pripremljen je miješanjem 100 mL TBS pufera dvadeset puta veće koncentracije i 400 μL Tween® 20 u 2 L destilirane vode.

Tris glicinski transfer pufer pripremljen je kao koncentrirana otopina deset puta veće koncentracije otapanjem 37,9 g Trizma® baze i 180,2 g glicina u 1 L destilirane vode.

Transfer pufer pripremljen je miješanjem 100 mL tris glicinskog transfer pufera deset puta veće koncentracije, 1600 mL destilirane vode, 400 mL metanola i 2 mL 10 %-tne otopine SDS-a. Pufer je pripremljen neposredno prije korištenja i ohlađen na 4°C .

Laemmlijev pufer pripremljen je kao koncentrirana otopina četiri puta veće koncentracije otapanjem 302,8 mg Trizma® baze, 0,8 g SDS-a, 4 g glicerola, 0,8 mg bromfenol plavog, 2 mL β -merkaptetanola u 6 mL destilirane vode, te je nadopunjeno do 10 mL. Pufer je raspodijeljen u mikroeprovete i čuvan na -20°C .

Homogenizacijski pufer pripremljen je miješanjem 9 mL $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ otopine NaCl, 1,35 mL 200 mmol dm^{-3} otopine KCl, 0,5 mL 200 mmol dm^{-3} otopine MgCl_2 , 5 mL 20 %-tne otopine Tritona X-100, 13,4 mL 75 %-tne otopine glicerola, 2 mL otopine 1 mol dm^{-3} otopine Trizma® baze pH 7,8, 2 mL $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ otopine NAF, 200 μL 500 mmol dm^{-3} otopine EDTA u 100 mL destilirane vode. Neposredno prije korištenja pufera dodati 500 μL 100 mmol dm^{-3} otopine Na_3VO_4 i 100 μL 200 mmol dm^{-3} otopine PMSF-a.

XT MES pufer pripremljen je miješanjem 50 mL komercijalno kupljene XT MES 20x koncentrirane otopine (BioRad, SAD) u 1 L destilirane vode.

Pufer za blokiranje membrane pripremljen je otapanjem 500 mg Tropix® I-BLOCK™ u TBS 1x puferu uz miješanje i zagrijavanje na magnetnoj miješalici. Pufer korišten nakon što se otopio i ohladio.

3.1.4. Oksimi

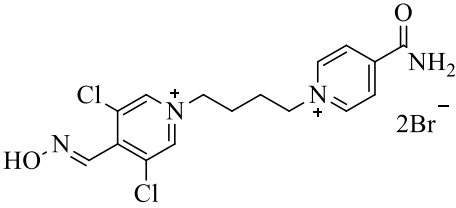
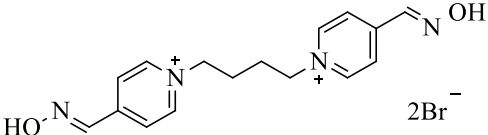
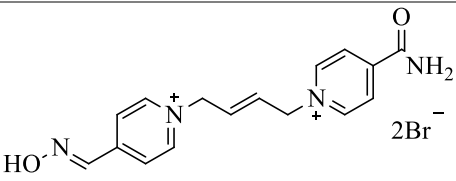
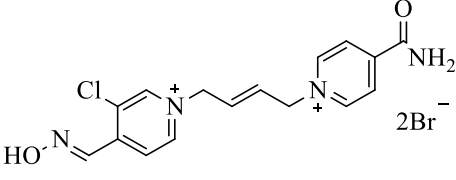
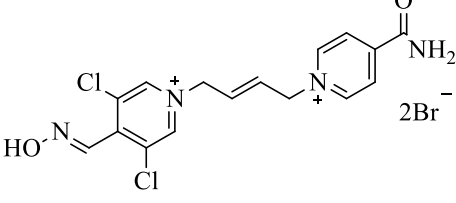
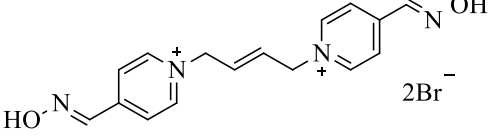
U ovoj doktorskoj disertaciji testirano je pet serija spojeva oksimske strukture: bispiridinijevi oksimi (**tablica 3.2**), imidazolijevi oksimi (**tablica 3.3**), kinuklidinijevi oksimi (**tablica 3.4**), 3-

hidroksi-2-piridinski oksimi (**tablica 3.5**) i referentni oksimi koji se koriste u medicinskoj praksi ili je njihovo djelovanje poznato (**tablica 3.6**).

Bispiridinijevi oksimi sintetizirani su u *Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences* i *Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Králové*, Hradec Králové, Češka Republika pod vodstvom dr. sc. Kamila Musileka i dr. sc. Kamila Kuče^{24,82,93,122,155}. Ishodne otopine oksima (10 ili 100 mmol dm⁻³) priređene su u destiliranoj vodi i čuvane pri 4 °C, dok su daljnja razrjeđenja oksima pripravljena neposredno prije pokusa u destiliranoj vodi, PBS-u ili mediju za uzgoj stanica. Bispiridinijevi oksimi testirani su u rasponu koncentracija od 1,54 – 800 µmol dm⁻³.

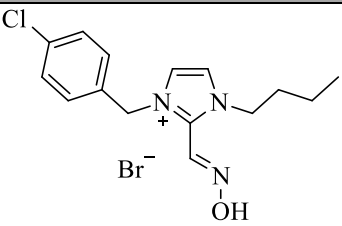
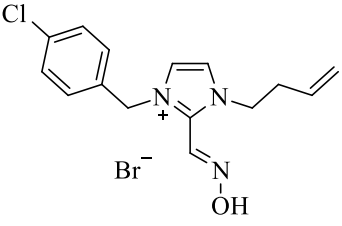
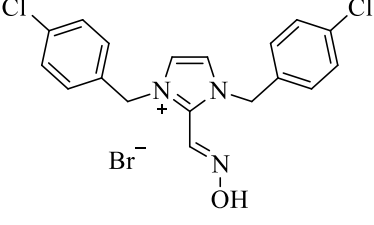
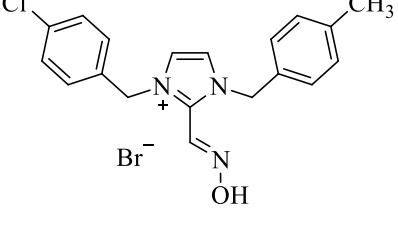
Tablica 3.2. Oznake, strukturne formule i IUPAC imena bispiridinijevih oksima testiranih u ovom radu.

Oksimi	Struktura	IUPAC kemijsko ime spoja
K027		4-karbamoil-1-(3-{4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}propil)piridinijev dibromid
K865		4-karbamoil-1-(3-{3-klor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}propil)piridinijev dibromid
K868		4-karbamoil-1-(3-{3,5-diklor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}propil)piridinijev dibromid
TMB-4		4-[(hidroksiimin)metil]-1-(3-{4-[(hidroksiimin)metil]piridinio}propil)piridinijeva dibromid
K048		4-karbamoil-1-(4-{4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}butil)piridinijev dibromid
K866		4-karbamoil-1-(4-{3-klor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}butil)piridinijev dibromid

K869		4-karbamoil-1-(4-{3,5-diklor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}butil)piridinijev dibromid
K074		1,1'-(butano)bis[4-(hidroksiimino)metil]piridinijev dibromid
K203		4-karbamoil-1-(4-{4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}but-2-enil)piridinijev dibromid
K867		4-karbamoil-1-(4-{3-klor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}but-2-enil)piridinijev dibromid
K870		4-karbamoil-1-(4-{3,5-diklor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}but-2-enil)piridinijev dibromid
K075		1,1'-(but-2-eno)bis[4-(hidroksiimino)metil]piridinijev dibromid

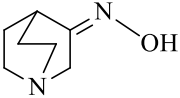
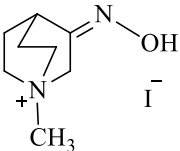
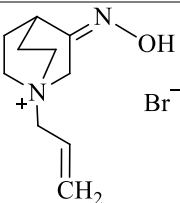
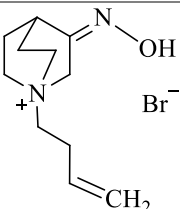
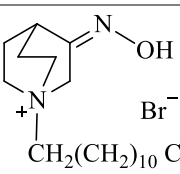
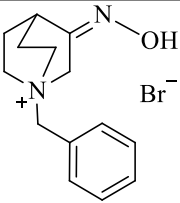
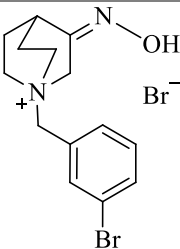
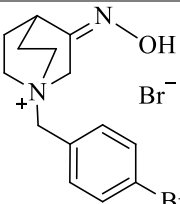
Imidazolijski oksimi sintetizirani su na Kemijskom odsjeku, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, pod vodstvom prof. dr. sc. Ines Primožič²⁵. Ishodne otopine oksima IV i VI (10 mmol dm^{-3}) pripremljene su u destiliranoj vodi, dok su ishodne otopine oksima VII i X (100 mmol dm^{-3}) pripremljene u DMSO i otopine su čuvane na 4°C . Daljnja razrjeđenja oksima pripravljena su neposredno prije pokusa u destiliranoj vodi, PBS-u ili mediju za uzgoj stanica. Imidazolijski oksimi testirani su u rasponu koncentracija od $6,25 - 800 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$.

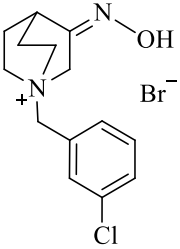
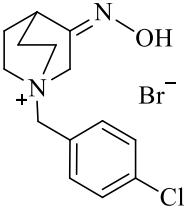
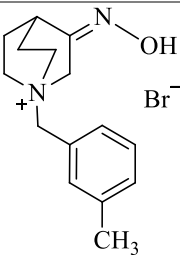
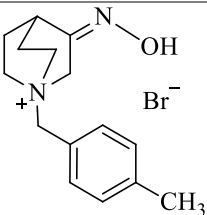
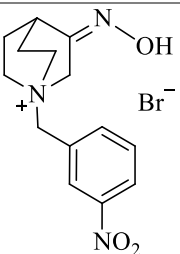
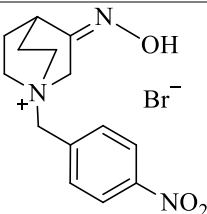
Tablica 3.3. Oznake, strukturne formule i IUPAC imena imidazolijskih oksima testiranih u ovom radu.

Oksimi	Struktura	IUPAC kemijsko ime spoja
IV		1-butyl-3-(4-klorbenzil)-2- [(hidroksiimino)metil]imidazolijev bromid
VI		1-(but-3-en-1-il)-3-(4-klorbenzil)-2- [(hidroksiimino)metil]imidazolijev bromid
VII		1,3-bis(4-klorbenzil)-2- [(hidroksiimino)metil]imidazolijev bromid
X		3-(4-klorbenzil)-2-[(hidroksiimino)metil]- 1-(4-metilbenzil)imidazolijev bromid

Kinuklidinijevi oksimi sintetizirani su na Kemijskom odsjeku, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, pod vodstvom prof. dr. sc. Ines Primožić¹⁵⁶. Ishodne otopine oksima Q1 – Q14 (10 mmol dm⁻³) pripremljene su u destiliranoj vodi, dok je ishodna otopina oksima Q5 (100 mmol dm⁻³) pripremljena u DMSO. Otopine su čuvane na 4 °C. Daljnja razrjeđenja oksima pripravljena su neposredno prije pokusa u destiliranoj vodi, PBS-u ili mediju za uzgoj stanica. Kinuklidinijevi oksimi testirani su u rasponu koncentracija od 6,25 - 800 μmol dm⁻³.

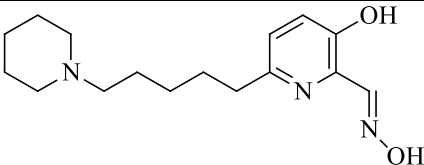
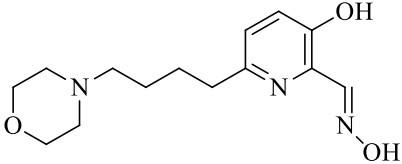
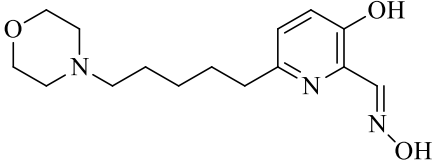
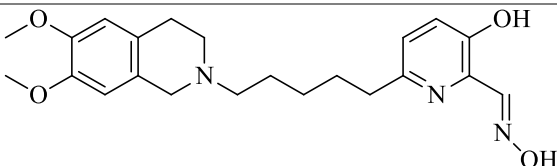
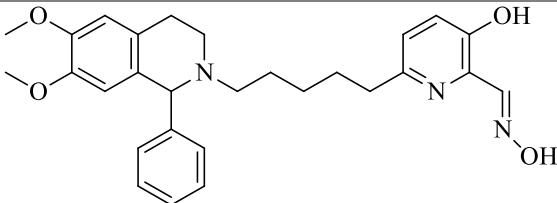
Tablica 3.4. Oznake, strukturne formule i IUPAC imena kinuklidinijevih oksima testiranih u ovom radu.

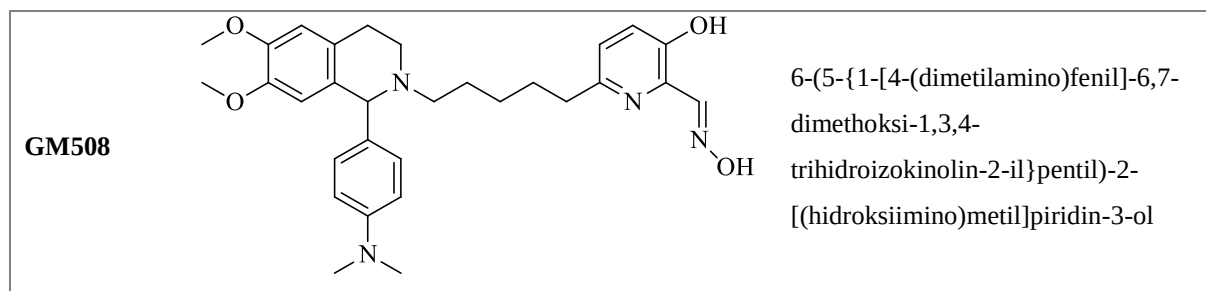
Oksimi	Struktura	IUPAC kemijsko ime spoja
Q1		Kinuklidin-3-on-oksım
Q2		3-(hidroksiimino)-1-metilkinuklidinijev jodid
Q3		1-alil-3-(hidroksiimino)kinuklidinijev bromid
Q4		1-(but-3-en-1-il)-3-(hidroksiimino)kinuklidinijev bromid
Q5		1-dodecil-3-(hidroksiimino)kinuklidinijev bromid
Q6		1-benzil-3-(hidroksiimino)kinuklidinijev bromid
Q7		1-(3-brombenzil)-3-(hidroksiimino)kinuklidinijev bromid
Q8		1-(4-brombenzil)-3-(hidroksiimino)kinuklidinijev bromid

Q9		1-(3-klorbenzil)-3-(hidroksiimino)kinuklidinijev bromid
Q10		1-(4-klorbenzil)-3-(hidroksiimino)kinuklidinijev bromid
Q11		3-(hidroksiimino)-1-(3-metilbenzil)kinuklidinijev bromid
Q12		3-(hidroksiimino)-1-(4-metilbenzil)kinuklidinijev bromid
Q13		3-(hidroksiimino)-1-(3-nitrobenzil)kinuklidinijev bromid
Q14		3-(hidroksiimino)-1-(4-nitrobenzil)kinuklidinijev bromid

3-hidroksi-2-piridinski oksimi sintetizirani su na *Normandie Université, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA (UMR 6014)*, Rouen, Francuska, pod vodstvom prof. dr. sc. Ludovica Jeana i prof. dr. sc. Pierre-Yvesa Renarda^{23,157}. Ishodne otopine oksima JR585, JR595, RM048, GM113 i GM508 (100 mmol dm⁻³) pripremljene su u DMSO, dok je ishodna otopina oksima GM415 (50 mmol dm⁻³) pripremljena u metanolu ili u DMSO (100 mmol dm⁻³). Otopine su čuvane na 4 °C. Daljnja razrjeđenja oksima pripravljena su neposredno prije pokusa u vodi, PBS-u ili mediju za uzgoj stanica. 3-hidroksi-2-piridinski oksimi testirani su u rasponu koncentracija od 2,34 - 800 μmol dm⁻³. Zbog ograničene topljivosti u vodenom mediju GM508 je testiran u rasponu do 300 μmol dm⁻³, dok su RM048 i GM415 testirani u rasponu do 500 μmol dm⁻³.

Tablica 3.5. Oznake, strukturne formule i IUPAC imena 3-hidroksi-2-piridinskih oksima testiranih u ovom radu.

Oksimi	Struktura	IUPAC kemijsko ime spoja
JR585		2-[(hidroksiimino)metil]-6-[5-(piperidin-1-il)pentil]piridin-3-ol
JR595		2-[(hidroksiimino)metil]-6-[4-(morfolin-4-il)butil]piridin-3-ol
RM048		2-[(hidroksiimino)metil]-6-[5-(morfolin-4-il)pentil]piridin-3-ol
GM415		6-[5-(6,7-dimetoksi-1,3,4-trihidroizokinolin-2-il)pentil]-2-[(hidroksimino)metil]piridin-3-ol
GM113		6-[5-(6,7-dimetoksi-1-fenil-1,3,4-trihidroizokinolin-2-il)pentil]-3-[(hidroksimino)metil]piridin-3-ol



Oksimi HI-6, LüH-6 i Hlö-7 sintetizirani su u *Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Králové, Česka Republika* pod vodstvom dr. sc. Kamila Kuče^{90,155}. 2-PAM, kupljen je od tvrtke *Sigma-Aldrich*, Njemačka. Izvorne otopine referentnih oksima (100 mmol dm^{-3}), priređene su u destiliranoj vodi i čuvane pri 4°C . Daljnja razrjeđenja oksima pripravljena su neposredno prije pokusa u destiliranoj vodi, PBS-u ili mediju za uzgoj stanica. Referentni oksimi testirani su u rasponu koncentracija od $6,25 - 800 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Tablica 3.6. Oznake, strukturne formule i IUPAC imena referentnih oksima testiranih u ovom radu.

Oksimi	Struktura	IUPAC kemijsko ime spoja
2-PAM		2-[(hidroksiimino)metil]-1-metilpiridinijev klorid
HI-6		4-karbamoil-1-[(2-[(hidroksiimino)metil]piridinio}metoksi)metil]piridinijev diklorid
LüH-6		4-[(hidroksiimino)metil]-1-[(4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}metoksi)metil]piridinijev diklorid
Hlö-7		2,4-di[(hidroksiimino)metil]-1-[(4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}metoksi)metil]piridinijev diklorid

3.2. Stanične kulture

3.2.1. Uzgoj staničnih kultura

Za istraživanje su korištene su certificirane kulture: ljudske živčane stanice SH-SY5Y (ECACC 94030304; *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska), ljudske stanice jetre HepG2 (ECACC 85011430; *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska), ljudske embrionalne stanice bubrega HEK293 (ECACC 85120602; *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska) i ljudske stanice bubrega odraslih HK-2 (ATCC® CRL-2190™, *American Type Culture Collection*, SAD). Nadalje, korištene su i primarne stanice koštanih mišića, mioblasti i miotubuli. Primarne stanice izolirane su na Institutu za patofiziologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Ljubljani, pod vodstvom prof. dr. sc. Sergeja Pirkmajera u skladu s dozvolama nadležnog etičkog povjerenstva. Svi eksperimenti na primarnim kulturama provedeni su na Institutu za patofiziologiju, u Ljubljani, odobreni Etičkim povjerenstvom Ministarstva zdravstva Republike Slovenije (#71/05/12 i #0120-698/2017/4). Sve stanice uzgajane su kao adherentne kulture pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO₂ i temperaturi 37 °C) i u odgovarajućim medijima uz dodatak 1 % otopine antibiotika penicilin-streptomycin (Pen-Strep, *Sigma-Aldrich*, Njemačka). SH-SY5Y stanična linija uzgajana je u *Dulbecco's Modified Eagle F12* mediju (DMEM F12, *Sigma-Aldrich*, Njemačka) uz dodatak 15 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS) (*Sigma-Aldrich*, Njemačka), 2 mmol dm⁻³ glutamina (*Sigma-Aldrich*, Njemačka) i 1 % neesencijalnih aminokiselina (*Sigma-Aldrich*, Njemačka). HepG2 i HEK293 stanične linije uzgajane su u *Eagle's Minimum Essential* mediju s Earlovim solima i natrijevim bikarbonatom bez L-glutamina (EMEM, *Sigma-Aldrich*, Njemačka) uz dodatak 2 mmol dm⁻³ glutamina, 10 % (v/v) FBS (*Sigma-Aldrich*, Njemačka) i 1 % neesencijalnih aminokiselina. HK-2 stanična linija uzgajana je u *Dulbecco's Modified Eagle* mediju (DMEM, *Capricorn Scientific*, Njemačka) uz dodatak 10 % (v/v) FBS (*Gibco*, Ujedinjeno Kraljevstvo). Nediferencirane mišićne stanice mioblasti, pripremljene iz mišićnog tkiva koje je rutinski odbačeno za vrijeme ortopedskih operacija¹⁵⁸. Uzgajani su u *Advanced Minimal Essential* mediju (advMEM, *Invitrogen*, Ujedinjeno Kraljevstvo), uz dodatak 10 % (v/v) FBS (*Invitrogen*, Ujedinjeno Kraljevstvo), 0,3 % (v/v) fungizona (*Invitrogen*, Ujedinjeno Kraljevstvo), 0,15 % (v/v) gentamicina (*Invitrogen*, Ujedinjeno Kraljevstvo). Miotubuli, diferencirane mišićne stanice, uzgajani su u *Advanced Minimal Essential* mediju (advMEM, *Invitrogen*, Ujedinjeno Kraljevstvo), uz dodatak 2 % (v/v) FBS (*Invitrogen*, Ujedinjeno

Kraljevstvo), 0,3 % (v/v) fungizona (*Invitrogen*, Ujedinjeno Kraljevstvo), 0,15 % (v/v) gentamicina (*Invitrogen*, Ujedinjeno Kraljevstvo). Donori primarnih stanica nisu imali neuromuskularne bolesti i mišićne stanice minimalno tri različita donora korištene su za svako provedeno testiranje.

Stanice su uzgajane u posudama za uzgoj, a za odvajanje stanica od podloge korištena je otopina tripsina i EDTA (*Sigma-Aldrich*, Njemačka), nakon čega su stanice resuspendirane u odgovarajućem mediju (uz prisustvo FBS-a) i nasađene u odgovarajućem broju na pločice za provedbu pokusa.

3.2.2. Određivanje broja stanica u uzorku

Broj živih/mrtvih stanica u uzorku određen je pomoću diferencijalnog bojanja tripan plavim. Naime, ova boja ne ulazi u žive stanice zbog negativnog naboja membrane, već samo u stanice s oštećenom membranom (mrtve stanice) gdje boji jezgru ili citoplazmu¹⁵⁹. Diferencijalno bojanje je provedeno prema protokolu proizvođača uređaja za brojanje stanica TC20™. U mikroepreveti je pomiješano 20 µL nerazrijeđene suspenzije stanica (dobivene nakon odvajanja stanica od podloge) i 20 µL otopine tripan plavo. Potom, otpipetirano je 10 µL smjese u komoricu pločice za brojanje (*Cell Counting Slides*, *BioRad*, SAD) i postavljeno u uređaj. Uređaj automatski broji stanice i rezultat prikazuje kao ukupan broj stanica po mililitru, kao i postotak živih stanica u uzorku.

3.3. Stanični testovi *in vitro*

3.3.1. Određivanje citotoksičnosti oksima praćenjem promjene vijabilnosti stanica

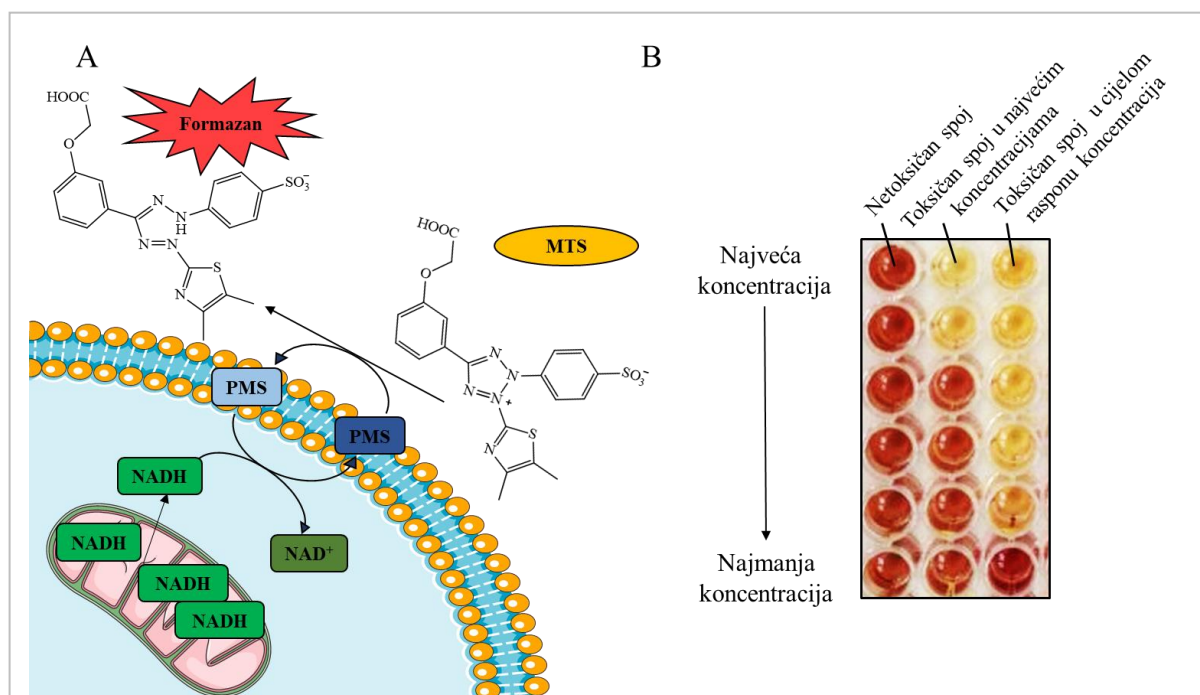
Vijabilnost stanica izloženih testiranim spojevima praćena je tzv. MTS testom. MTS (ili Owenov reagens) je tetrazolijeva sol žute boje koja se u određenim uvjetima pod djelovanjem staničnih enzima reducira u obojani formazanski produkt (smeđe-ljubičaste boje) topljiv u mediju (**slika 3.1**). Sam proces je potaknut redukcijom/oksidacijom NADPH i/ili NADH enzimima dehidrogenazama u metabolički aktivnim stanicama te prijenosom elektrona pomoću reagensa za prijenos elektrona (PMS, fenazin metasulfata). Porast koncentracije formazanskog produkta, proporcionalan broju metabolički aktivnih stanica, praćen je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 490 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Prema dobivenim vrijednostima izračunat je postotak promjene vijabilnosti stanica izloženih testiranim spojevima u odnosu na

netretirane kontrolne stanice, te je određena koncentracija pri kojoj je 50 % stanica živih, odnosno, koncentracija testiranog spoja koja inhibira rast 50 % stanica, kratice IC₅₀ (engl. *inhibitory concentration*) vrijednost.

Prema dobivenim rezultatima utjecaja otapala na stanične kulture ovisno o koncentraciji otapala i korištenoj staničnoj kulturi, koncentracije DMSO-a i metanola kao otapala za određene oksime u svim pokusima bila je ispod 0,8 % i 0,5 % kako bi se zanemario njihov utjecaj na određivane parametre (**slika 3.2**).

U prvom dijelu istraživanja ispitana je toksičnost spojeva tijekom izloženosti stanica u trajanju od 24 sata. Za testiranje je odabran raspon koncentracija spojeva koji prema literaturnim podacima odgovara fiziološki i kinetički relevantnim koncentracijama istraživanja njihovog terapijskog potencijala^{23–25,85,88,118,122,156}. Koncentracijski raspon oksima i spojeva poznatog djelovanja (atrakurij besilat – antagonist nikotinskih receptora, atropin – antagonist muskarinskih receptora, acetilkolin – agonst acetilkolinskih receptora) obuhvaćao je koncentracije od 1 – 800 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, izuzev tri 3-hidroksi-2-piridinskih oksima koji su zbog ograničene topljivosti testirani u koncentracijama do 300 (GM113 i GM508) ili 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (RM048 i GM415) te poznatog induktora apoptoze, staurosporina u rasponu od 0,03 – 4 $\mu\text{mol dm}^{-3}$.

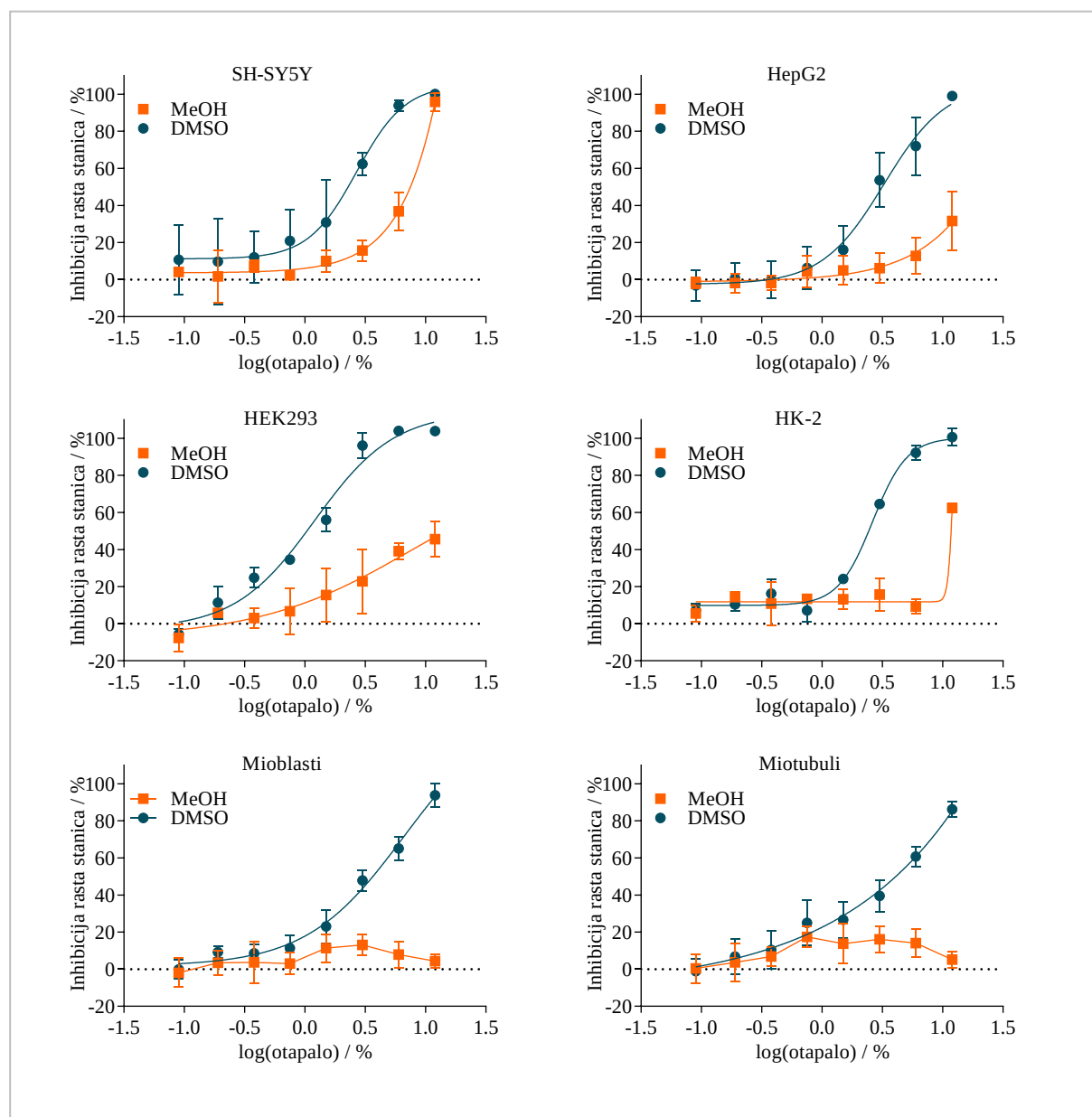
Za eksperiment nasadeno je 20 000 stanica po jažici na mikrotitarske pločice s 96 jažica, dan prije eksperimenta. Drugi dan, nakon što je aspiriran stanični medij, u jažice su dodane otopine spojeva u staničnom mediju u odabranom rasponu koncentracija ukupnog volumena 120 μL po jažici. Spojevi su testirani u serijskom razrjeđenju po 8 koncentracija (u omjeru 1:2). Stanice su zatim inkubirane tijekom 24 sata pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO₂ i temperaturi 37 °C). Nakon inkubacije, stanice su isprane PBS puferom kako bi se uklonili testirani spojevi te je dodano 100 μL čistog medija i 20 μL MTS reagensa te su vraćene u inkubator. Nakon 1 – 4 sata (ovisno o razvoju boje) očitana je apsorbancija pri 490 nm te su računski određene IC₅₀ vrijednosti.



Slika 3.1. A) Princip MTS metode – MTS (žute boje) djelovanjem staničnih enzima reducira se u formazan (smeđe-ljubičaste boje) topljiv u mediju uz redukciju/oksidaciju NADPH i/ili NADH enzimima dehidrogenazama i prijenos elektrona pomoću reagensa za prijenos elektrona (PMS) u metabolički aktivnim stanicama. Porast koncentracije formazana proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica i B) Promjena boje reagensa nakon inkubacije u prisutnosti živih i mrtvih stanica (prema kitu *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit*).

Za odabrane spojeve, koji su se pokazali toksični unutar 24 sata pri testiranom rasponu koncentracija, ispitana je nadalje toksičnost u vremenskoj i koncentracijskoj ovisnosti. Naime, za svaki pojedini spoj utvrđena je toksičnost u dodatne dvije vremenske točke, 1 i 4 sata, i koncentracija spoja kod koje dolazi do pojave toksičnosti, zbog utvrđivanja mehanizma odgovornog za učinke spojeva na stanicama.

Dodatno, da bi se procjenilo uzrokuju li testirani spojevi aditivni, sinergistički, potencijalski ili protektivni učinak na razini stanica. Stanice su izložene kroz 4 h i kombinaciji toksičnih spojeva, u koncentraciji svakog koja inhibira do 20 – 25 % rasta stanica ($\approx IC_{20}$) odnosno tzv. LOAEL dozi spoja (engl. *Low Observed Adverse Effect Level*).

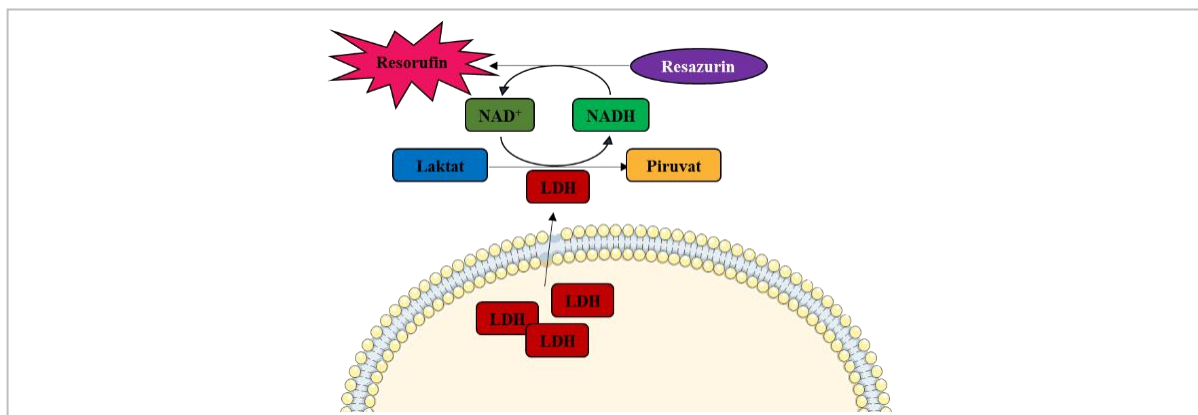


Slika 3.2. Utjecaj otapala na stanice korištene u ovom radu – ovisnost inhibicije rasta stanica o postotku (v/v) otapala. Vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška) iz eksperimentalno dobivenih vrijednosti inhibicije rasta stanica u 24 sata MTS metodom. Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa.

3.3.2. Određivanje integriteta stanične membrane

Integritet stanične membrane provjeren je testom koji se bazira na mjerenju aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH) ispuštene u stanični medij. Otpuštanje LDH je indikacija oštećenja integriteta membrane i najčešće je povezano s pucanjem stanice pri nereguliranoj staničnoj smrti, nekrozi¹⁶⁰. Metoda je slikovno prikazana na **slici 3.3**. Naime, aktivnost LDH određuje se posredno pomoću reagensa resazurina koji se reducira u resorufin potaknut konverzijom NADH-om u staničnom mediju nakon otpuštanja LDH iz stanice (**slika 3.3**). Porast signala,

proporcionalan aktivnosti LDH, praćen je fluorimetrijom pri valnoj duljini ekstinkcije od 560 nm i emisije od 590 nm na čitaču mikrotitarskih pločica.



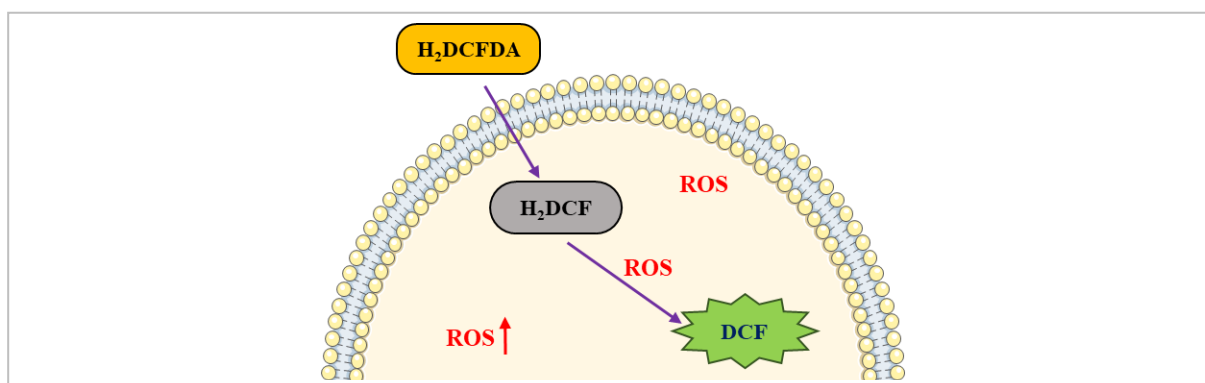
Slika 3.3. Princip metode kojom je određen integritet membrane nakon otpuštanja LDH iz stanice (prema kitu *CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay Kit*).

Test je proveden pri izloženosti stanica spojevima u koncentraciji koja uzrokuje smrt stanice u 4 sata, a koje su određene prethodnim MTS testom. Koncentracijski raspon oksima obuhvaćao je koncentracije do $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$, izuzev 3-hidroksi-2-piridinskih oksima koji su zbog ograničene topljivosti testirani u koncentracijama do 300 (GM113 i GM508) ili $500 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (GM415).

Za eksperiment nasađeno je 10 000 stanica po jažici na crne mikrotitarske pločice s 96 jažica s prozirnim dnom, dan prije eksperimenta. Drugi dan, nakon što je aspiriran stanični medij, u jažice su dodane otopine spojeva u staničnom mediju u četiri koncentracije, ukupnog volumena $100 \mu\text{L}$ po jažici. Stanice su inkubirane s otopinama oksima tijekom 3,5 sata pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO_2 i temperaturi 37°C), nakon čega su izvađene iz inkubatora da se ekvilibriraju na sobnu temperaturu 30 minuta. Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*, Njemačka) finalne koncentracije 0,18 % (v/v) (izvorna otopina 9 %-tna otopina u vodi) je korišten kao pozitivna kontrola. Dodano je $2 \mu\text{L}$ 9 %-tne otopine Tritona u predviđene jažice 5 minuta prije dodatka reagensa. U svaku jažicu dodano je još $100 \mu\text{L}$ reagensa, orbitalno protreseno 30 sekundi, 10 minuta inkubirano na sobnoj temperaturi u tami te je signal izmjeren pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Rezultat je prikazan kao postotak otpuštenog LDH u odnosu na pozitivnu kontrolu tj. maksimalno otpušten LDH iz stanice.

3.3.3. Određivanje indukcije reaktivnih kisikovih vrsta

Indukcija reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) određena je posredno korištenjem specifične boje 2',7'-diklorofluorescein-diacetat (DCFDA) koja se prilikom prolaska (pasivno) kroz membrane deacetilira staničnim esterazama u ne-fluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (H_2DCF). H_2DCF se oksidira u prisutnosti reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u DCF (slika 3.4) čiji se fluorescentni signal određuje pri valnoj duljini ekstinkcije od 495 nm i emisije od 529 nm i proporcionalan je koncentraciji ROS-ova u stanici.



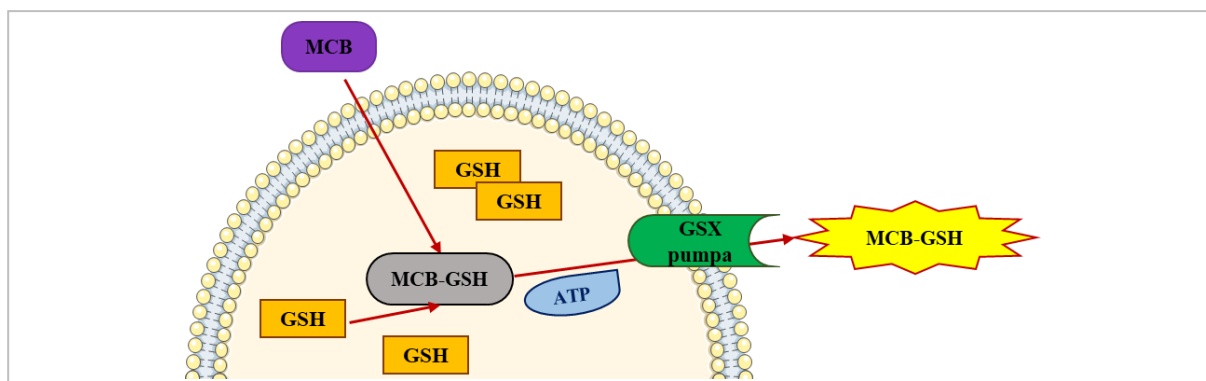
Slika 3.4. Princip metode određivanja indukcije reaktivnih kisikovih vrsta pomoću specifične fluorescentne boje DCFDA (prema referenci ¹⁶¹).

Za eksperiment nasadeno je 20 000 stanica po jažici na crne mikrotitrarske pločice s 96 jažica s prozirnim dnom, dan prije eksperimenta. Drugi dan, nakon što je aspiriran stanični medij, u jažice su dodane otopine spojeva u staničnom mediju u LOAEL koncentracijama, ukupnog volumena 100 μ L po jažici. Stanice su inkubirane s otopinama oksima tijekom 4 sata pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO_2 i temperaturi 37 °C). Nakon inkubacije, stanice su isprane PBS puferom kako bi se uklonili testirani spojevi te je u svaku jažicu dodano 100 μ L DCFDA boje finalne koncentracije 50 μ mol dm^{-3} te je nakon 30 minuta izmjeren porast fluorescencije pomoću čitača mikrotitrarskih pločica. Vodikov peroksid (H_2O_2 , Sigma-Aldrich, Njemačka), finalne koncentracije 100 μ mol dm^{-3} je korišten kao pozitivna kontrola. Rezultat je prikazan kao omjer izmjerenih vrijednosti tretiranih u odnosu na netretirane stanice.

3.3.4. Određivanje antioksidacijskog potencijala stanice

Antioksidacijski potencijal stanice nakon izlaganja otopinama oksima, određen je mjerenjem koncentracije prisutnog glutationa (GSH) posredno korištenjem specifične boje monoklorobimana (MCB). Naime, monoklorobiman pasivno ulazi u stanicu gdje formira adukt

glutation–monoklorobiman (GSH – MCB) pomoću enzima glutation S transferaze. GSH-MCB specifična membranska pumpa uz utrošak energije izbacuje adukt van iz stanice u stanični medij (**slika 3.5**) te se prisutnost istog određuje na osnovi njegovog fluorescentnog signala pri valnoj duljini ekstinkcije od 355 nm i emisije od 460 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Signal je proporcionalan koncentraciji utrošenog GSH u stanici kao mjere ukupnog antioksidacijskog kapaciteta.



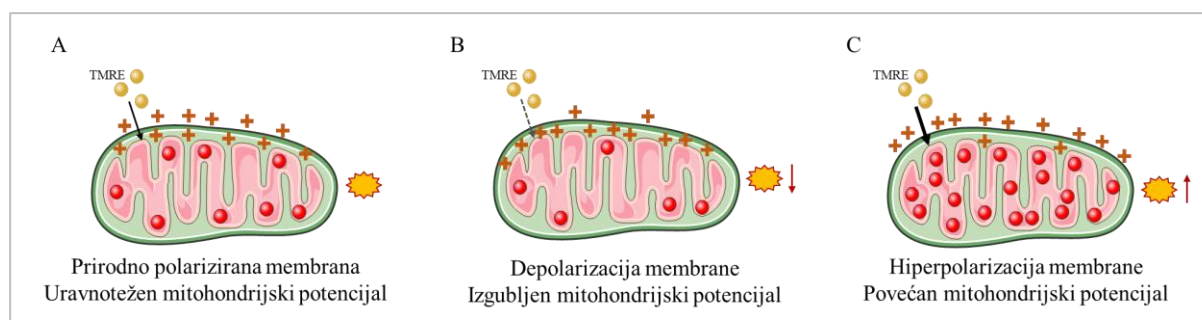
Slika 3.5. Princip metode određivanja antioksidacijski potencijala stanice pomoću specifične fluorescentne boje monoklorobimana (prema referenci ¹⁶²).

Za eksperiment nasadeno je 20 000 stanica po jažici na crne mikrotitarske pločice s 96 jažica s prozirnim dnom, dan prije eksperimenta. Drugi dan, nakon što je aspiriran stanični medij, u jažice su dodane otopine spojeva u staničnom mediju u LOAEL koncentracijama, ukupnog volumena 100 μL po jažici. Stanice su inkubirane s otopinama oksima tijekom 4 sata pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO_2 i temperaturi 37 °C). Nakon inkubacije, stanice su isprane PBS puferom kako bi se uklonili testirani spojevi te je u svaku jažicu dodano 100 μL monoklorobimana finalne koncentracije 40 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ te je nakon 40 minuta izmjeren porast fluorescencije pomoću čitača za mikrotitarske pločice. *Tert*-butilvodikov peroksid (tBOOH, *Sigma-Aldrich*, Njemačka), finalne koncentracije 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ je korišten kao pozitivna kontrola. Rezultat je prikazan kao omjer izmjerenih vrijednosti tretiranih u odnosu na netretirane stanice.

3.3.5. Određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala

Promjena mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) nakon izlaganja otopinama oksima, određena je mjerenjem intenziteta fluorescencije komercijalno dostupnog etilnog ester tetrametilrodaminperklorata (TMRE). Naime, TMRE je permeabilna boja koja se akumulira unutar neoštećenih mitohondrija zdravih stanica kao odgovor na visoki membranski potencijal

i negativan naboj (slika 3.6). Koncentracija TMRE u mitohondriju mijenja se s membranskim potencijalom. Zbog toga, stanice koje su izgubile membranski potencijal ili aktivnost mitohondrija ne mogu akumulirati TMRE zbog depolarizacije mitohondrija i dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije. Promjena akumulacije TMRE unutar mitohondrija određuje na osnovi njegovog fluorescentnog signala pri valnoj duljini ekstinkcije od 550 nm i emisije od 580 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Signal je proporcionalan koncentraciji akumuliranog TMRE u stanici kao mjere ukupnog mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$).

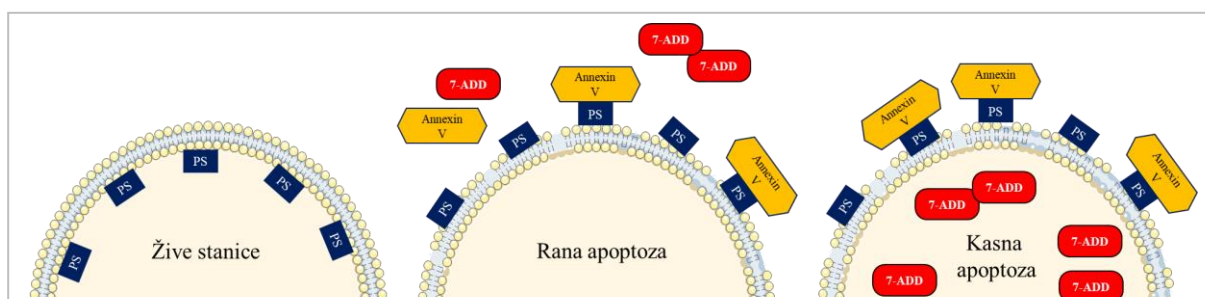


Slika 3.6. Princip metode određivanja mitohondrijskog membranskog potencijala stanice pomoću specifične fluorescentne boje TMRE. A) Prirodno polarizirana membrana s uravnoteženim mitohondrijskim potencijalom, B) Smanjen mitohondrijski potencijal uslijed depolarizacije membrane uzrokovane vanjskim faktorima uz posljedično smanjenje fluorescencije i C) Povećan mitohondrijski potencijal uslijed hiperpolarizacije membrane uzrokovane vanjskim faktorima uz posljedično povećanje fluorescencije (prema kitu *Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (II)*).

Za eksperiment nasadeno je 10 000 stanica po jažici na crne mikrotitarske pločice s 96 jažica s prozirnim dnom, dan prije eksperimenta. Drugi dan, nakon što je aspiriran stanični medij, u jažice su dodane otopine spojeva u staničnom mediju u LOAEL koncentracijama, ukupnog volumena 100 μL po jažici. Stanice su inkubirane s otopinama oksima tijekom 4 sata pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO_2 i temperaturi 37 $^{\circ}\text{C}$). Prije dodatka reagensa, u predviđene kontrolne jažice dodano je 10 μL 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ pozitivne kontrole CCCP (karbonilcijanidklorofenilhidrazon-perklorat, *Cell Signaling Technology Europe*, Nizozemska) te je pločica vraćena u inkubator na 15 minuta. Zatim je u svaku jažicu dodano još 10 μL 2 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ reagensa TMRE, finalne koncentracije 200 nmol dm^{-3} . Pločica je vraćena u inkubator na 20 minuta. Medij je aspiriran i stanice su isprane tri puta s PBS-om te je potom dodano 100 μL PBS-a u svaku jažicu. Porast ili smanjenje fluorescencije nakon tretmana određen je pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Rezultat je prikazan kao omjer izmjerenih vrijednosti tretiranih u odnosu na netretirane stanice.

3.3.6. Određivanje indukcije procesa apoptoze

Indukcija pojedinih faza procesa apoptoze određena je korištenjem komercijalnog kita koji sadrži reagensse Annexin V i 7-aminoaktinomycin D (7-AAD). Annexin V je fosfolipid–vezujući protein ovisan o kalciju s visokim afinitetom za fosfatidilserin, komponentu stanične membrane lokaliziranu na citoplazmatskoj strani u normalnim uvjetima. U ranoj apoptozi molekule fosfatidilserina se translociraju na vanjsku stranu membrane što potom omogućava vezanje Annexina V i detekciju signala. Reagens 7-AAD ulazi u stanicu samo u slučaju oštećenja membrana i selektivno se veže na GC regije unutar DNA te se time detektira proces kasne apoptoze ili smrti stanice (**slika 3.7**).

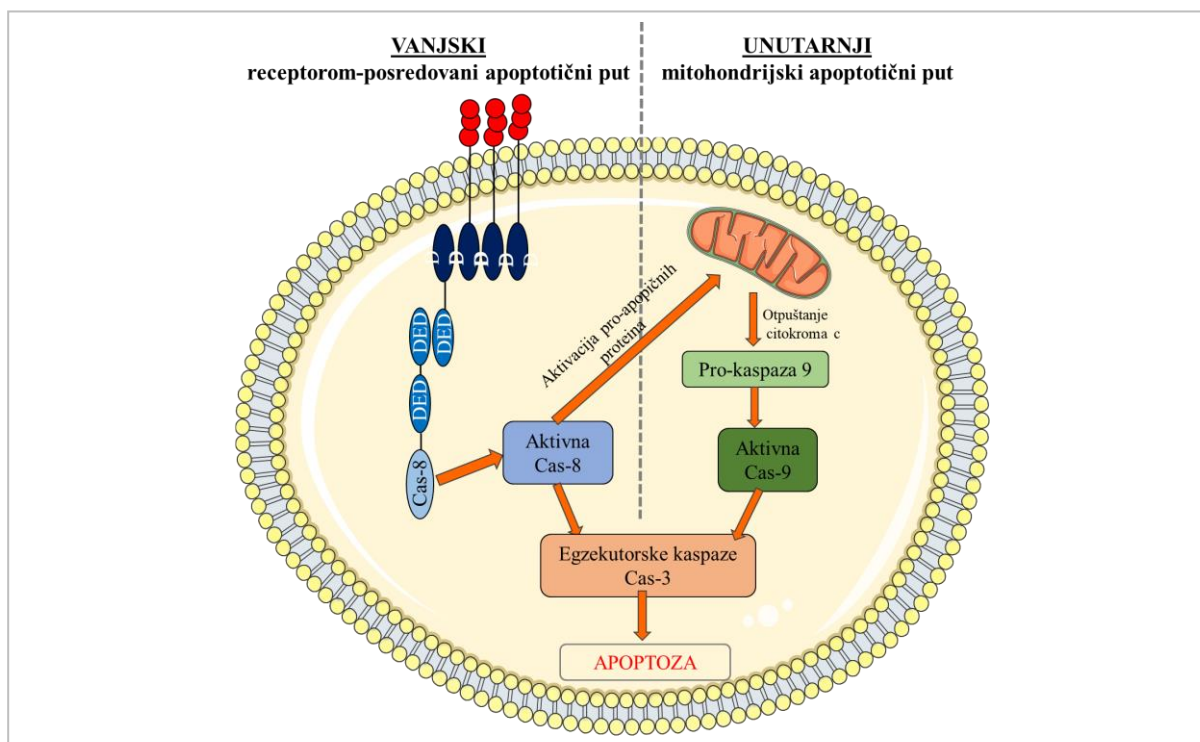


Slika 3.7. Princip metode određivanja indukcije procesa rane i kasne apoptoze pomoću Annexina V i 7-AAD (prema kitu *Annexin V Assay Kit*).

Za eksperiment nasađeno je 30 000 stanica po jažici na prozirne pločice s 12 jažica dva dana prije eksperimenta. Treći dan, nakon što je aspiriran stanični medij, u jažice su dodane otopine spojeva u staničnom mediju u LOAEL koncentracijama, ukupnog volumena 500 μL po jažici. Stanice su inkubirane s otopinama oksima tijekom 4 sata pri kontroliranim uvjetima (5 % $p\text{CO}_2$ i temperaturi 37 $^{\circ}\text{C}$). Stanice su potom na pločici isprane PBS-om i tripsinizirane sa 150 μL 0.25 % otopinom Trypsin/EDTA. U svaku jažicu dodano je 500 μL kompletnog medija sa smanjenim udjelom seruma (DMEM + 5% FBS) kako bi se inaktiviralo djelovanje tripsina te je suspenzija stanica prebačena u mikroeprovete. Prema preporuci proizvođača određena je koncentracija stanica te je prema određenoj koncentraciji stanica dodan reagens; 80 μL suspenzije stanice prebačeno je u novu mikroeprovetu i dodano je 100 μL reagensa za detekciju te je smjesa 20 minuta inkubirana na sobnoj temperaturu u tami. Promjene na stanicama detektirane su praćenjem fluorescentnih proba mikrokapilarnom citometrijom na uređaju Guava® Muse® Cell Analyzer. Minimalno 4000 stanica je analizirano po jednom mjerenju. Eksperiment je proveden tri ili četiri puta (svaki najmanje u duplikatu). Rezultat je prikazan kao postotak stanica u pojedinim fazama stanične smrti u odnosu na netretirane stanice.

3.3.7. Određivanje aktivnosti specifičnih enzima kaspaza

U proces apoptoze uključeni su i specifični enzimi kaspaze (cistein-aspartat-ovisne c proteaze) koje imaju ili inicijatorsku ulogu ili egzekutorsku/izvršnu ulogu u procesu apoptoze. Zbog toga je određena aktivnost dviju specifičnih inicijatorskih kaspaza (kaspaza 8 i 9) i jedne egzekutorske kaspaze (kaspaza 3). Kaspaza 8 ima ulogu u vanjskom/receptorom-posredovanom apoptotičkom putu, koji se odvija preko receptora smrti (FasL, TNF α) nakon čega ona aktivira egzekutorske kaspaze 3, 6, 7, koje dalje cijepaju brojne stanične proteinske supstrate, koji uzrokuju programiranu smrt stanice odnosno apoptozu. Za razliku od kaspaze 8, kaspaza 9 ima ulogu u unutarnjem/mitohondrijskom apoptotičkom putu, iniciraju ju enzimi citokromi c otpušteni u citoplazmu nakon oštećenja mitohondrija (**slika 3.8**). Aktivnost specifičnih enzima kaspaza nakon izlaganja otopinama oksima, određena je upotrebom komercijalno dostupnog kita mjerenjem intenziteta fluorescencije komercijalno dostupnog kita *Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 Multiplex Activity Assay Kit* (Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo). U kitu su dostupni fluorogeni supstrati za mjerenje aktivnosti kaspaza: DEVD-ProRedTM za kaspazu 3, IETD-R110 za kaspazu 8 i LEHD-AMC za kaspazu 9. Nakon tretmana odabranim spojevima od interesa, kaspaza će u slučaju aktivnosti hidrolizirati pripadajući supstrat što će rezultirati otpuštanjem odgovarajućih fluorofoara: ProRedTM (crvena fluorescencija), R110 (zelena fluorescencija) i AMC (plava fluorescencije). Otpuštanje fluorofoara određuje se fluorescencijom pri valnim duljinama ekstinkcije i emisije od 535 nm i 490 nm (kaspaza 3), 490 nm i 525 nm (kaspaza 8) te 370 nm i 450 nm (kaspaza 9). Signal je proporcionalan aktivnosti određene kaspaze, a rezultat je prikazan kao omjer izmjerenih vrijednosti tretiranih u odnosu na netretirane stanice.



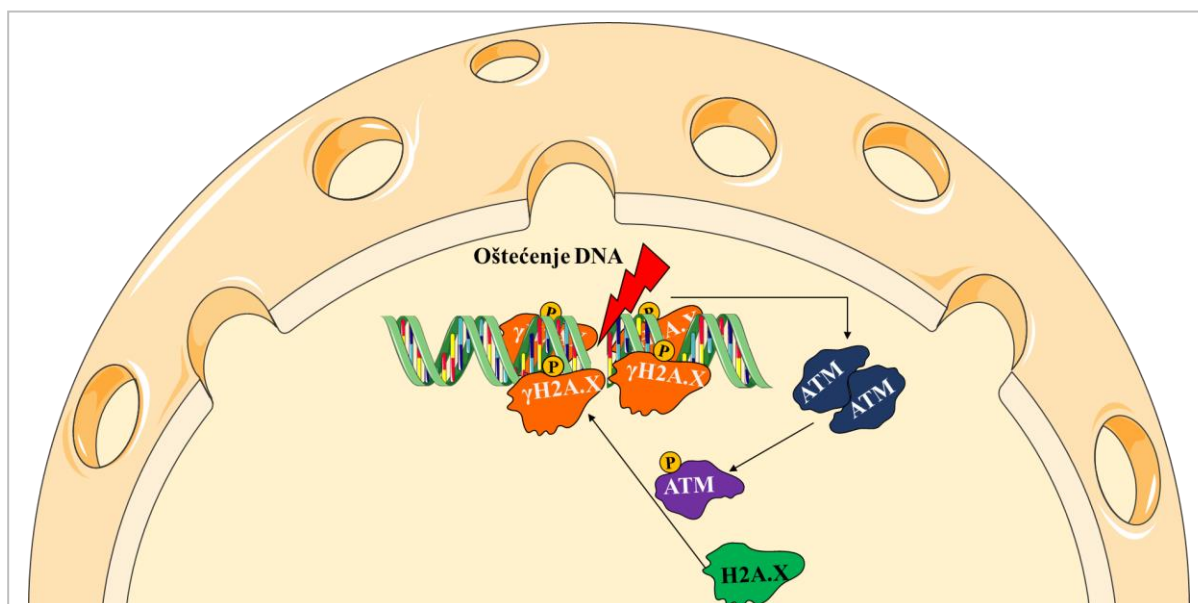
Slika 3.8. Princip metode određivanja aktivnosti specifičnih enzima kaspaze: izvršne kaspaze 3 i inicijatorskih kaspaza 8 i 9 (prema kitu *Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 Multiplex Activity Assay Kit*).

Za eksperiment nasadeno je 20 000 stanica po jažici, ukupnog volumena 90 μL , na crne mikrotitrarske pločice s 96 jažica dan prije eksperimenta. Drugi dan, u jažice je dodano i 10 μL deset puta koncentrirane otopine spojeva u PBS-u u LOAEL koncentracijama. Stanice su inkubirane s otopinama oksima tijekom 4 sata pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO_2 i temperaturi 37 °C). U svaku jažicu dodano je još 100 μL reagensa MultiPlex (Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo), 30 – 60 minuta inkubirano na sobnoj temperaturi u tami te je promjena fluorescencije izmjerena pomoću čitača mikrotitrarskih pločica. Staurosporin (Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo), finalne koncentracije 1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ je korišten kao pozitivna kontrola. Rezultat je prikazan kao omjer izmjerenih vrijednosti tretiranih u odnosu na netretirane stanice.

3.3.8. Oštećenja molekula DNA

Stanica koja je nakupila veću količinu oštećenja DNA ili ako više ne popravlja uspješno oštećenja u DNA može ući u procese biološkog starenja, apoptoze ili pak nekontrolirane stanične diobe. Oštećenje molekule DNA u stanici određeno je korištenjem komercijalnog kita koji sadrži specifična protutijela (obilježena fluorescentnim bojama) za aktivne oblike proteina ATM (*Ataxia telangiectasia* mutirana kinaza) i H2A.X (histon 2A.X). (slika 3.9). ATM kinaza

aktivira se fosforilacijom kao odgovor na oštećenje DNA (dvolančani lom) i nizvodno fosforilira i aktivira histon H2AX, koji se akumulira na mjestu oštećenja molekule DNA. Istodobnim mjerenjem promjene fluorescencije tj. fosforilacije kinaze ATM i histona H2A.X obilježene specifičnim protutijelima, posredno se određuje nastanak dvolančanih lomova unutar molekule DNA. Signal je proporcionalan koncentraciji aktivne kinaze ATM i histona H2A.X u stanici kao mjere ukupnog oštećenja molekula DNA.



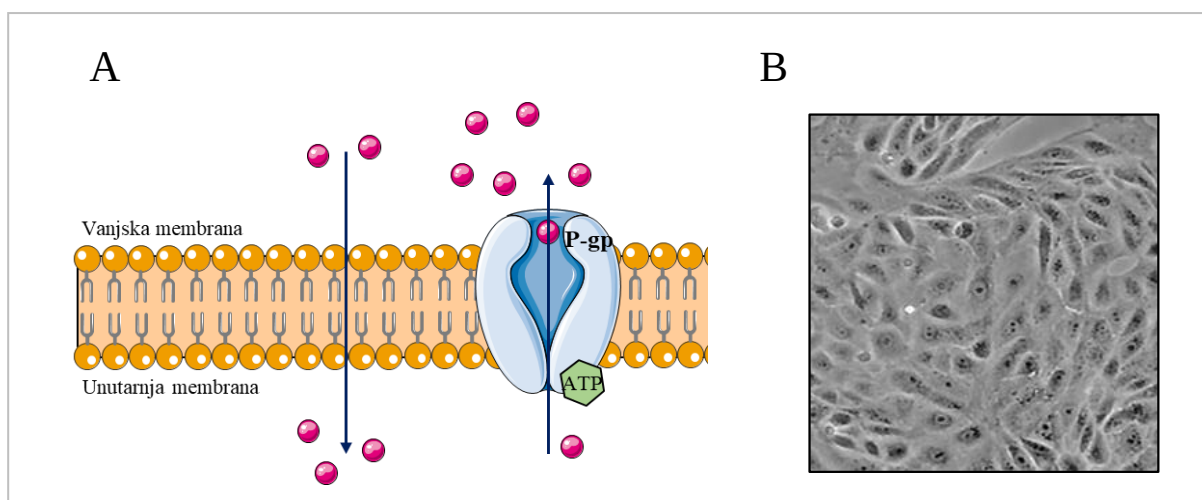
Slika 3.9. Princip metode određivanja oštećenja molekula DNA: ATM kinaza aktivira se fosforilacijom kao odgovor na oštećenje DNA (dvolančani lom) i nizvodno fosforilira i aktivira histon H2AX, koji se akumulira na mjestu oštećenja (prema kitu *Muse® Multi-Color DNA Damage Kit*).

Za eksperiment nasađeno je 100 000 stanica po jažici na prozirne pločice s 12 jažica tri dana prije eksperimenta. Četvrti dan, nakon što je aspiriran stanični medij, u jažice su dodane otopine spojeva u staničnom mediju u LOAEL koncentracijama, ukupnog volumena 500 μL po jažici. Stanice su inkubirane s otopinama oksima tijekom 4 sata pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO_2 i temperaturi 37 $^{\circ}\text{C}$). Stanice su potom na pločici isprane PBS-om i tripsinizirane sa 150 μL otopinom tripsin/EDTA. U svaku jažicu dodano je 500 μL kompletnog medija sa smanjenim udjelom seruma (DMEM + 5 % FBS) kako bi se inaktiviralo djelovanje tripsina te je suspenzija stanica prebačena u mikroepruvetu. Prema protokolu proizvođača stanice su centrifugirane te isprane puferom. Zatim su stanice fiksirane fiksacijskim puferom iz kita 10 min na ledu te sabijene u talog centrifugiranjem. Talog stanica ispran je puferom, stanice su permeabilizirane odgovarajućim puferom 10 min na ledu te ponovno centrifugirane i isprane. Nakon toga je stanični precipitat promiješan s 90 μL pufera te je staničnoj suspenziji dodano 10 μL koktela

protutijela i 30 minuta inkubirano na sobnoj temperaturi u tami. Stanicama je potom dodano 100 uL pufera te su zatim centrifugirane. Stanični je precipitat ispran i resuspendiran u 200 μ L pufera. Oštećenje molekule DNA detektirano je praćenjem fluorescentnih proba mikropilarnom citometrijom na uređaju Guava® Muse® Cell Analyzer. Minimalno 4000 stanica je analizirano po jednom mjerenju. Eksperiment je proveden tri puta (svaki najmanje u duplikatu). Rezultat je prikazan kao postotak ukupnog oštećenja DNA u odnosu na netretirane stanice.

3.3.9. Permeabilnost membrane na modelu MDCK stanične linije

Eksperimenti određivanja permeabilnosti provedeni su u suradnji s Petrom Mišetić, mag. chem. i dr. sc. Jasnom Padovan (Fidelta d.o.o., Zagreb, Hrvatska). MDCKII-MDR1 stanice su Madin-Darby pseće epitelne stanice bubrega (**slika 3.10B**), koje pojačano ekspimiraju ljudski gen za otpornost na različite lijekove (engl. *multi-drug resistance MDR1*), koji kodira P-glikoprotein (P-gp). MDCK stanice su općeprihvaćen model za brzi *in vitro* test pasivnog prolaska spojeva kroz membrane. Za mjerenje brzine prolaska kroz membrane koristi se prolazak spoja kroz jednoslojnu kulturu MDCKII-MDR1, izražen kao prividna propusnost (P_{app}). Prati se prolazak u oba smjera (iz apikalnog na bazolateralnu stranu (A2B) i bazolateralnog na apikalnu stranu (B2A)) za izračun efluksa (omjera prolaska). Korištenjem inhibitora P-gp pumpe, potvrđuje se posreduje li P-gp u transportu. P-gp pumpa je energetski ovisna pumpa koja smanjuje unutarstaničnu koncentraciju toksičnih spojeva u stanici njihovim izbacivanjem iz unutrašnjosti prema van uz utrošak ATP-a (**slika 3.10A**).



Slika 3.10. A) Princip metode djelovanja P-gp pumpi u stanici i B) mikroskopska slika MDCK stanične linije korištene za određivanje permeabilnosti odabranih spojeva (prema referenci ¹⁶³).

Za eksperiment nasađeno je 30 000 stanica po jažici na mikrotitarske pločice, četiri dana prije eksperimenta. Na dan eksperimenta, stanice su isprane PBS-om (*Sigma-Aldrich*, SAD) te je dodana otopina 1 %-tnog DMSO (*Sigma-Aldrich*, SAD) u PBS puferu i pločica je vraćena u inkubator na 45 minuta sa i bez inhibitora Elikridara ($2 \mu\text{mol dm}^{-3}$, *International Laboratory*, SAD). Oksimi ($10 \mu\text{mol dm}^{-3}$), amprenavir ($0,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$, *AK Scientific Inc.*, SAD) i diklofenak ($10 \mu\text{mol dm}^{-3}$, *Sigma-Aldrich*, SAD) pripremljeni su u transportnom mediju koji sadrži Lucifer žuto (*engl.* Lucifer yellow, LY; *EndoTherm*, Njemačka) u 1 %-tnom DMSO te sa i bez Elacridara. Baždarna krivulja LY pripremljena je serijskim razrjeđenjem u rasponu koncentracija do $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i fluorescentni signal određuje se pri valnoj duljini ekstinkcije od 485 nm i emisije od 529 nm. Početna koncentracija oksima u primarnom odjeljku (C_0) uzorkovana je na početku inkubacije, a na apikalnoj i bazolateralnoj strani na kraju eksperimenta. Uzorci su analizirani masenim spektrometrom API 4500 Triple Quadrupole (*AB Sciex, Division of MDS Inc.*, Kanada) spojenim s Nexera X2 UHPLC (*Shimadzu*, Japan). Kvantifikacija je izvedena metodom praćenja jednostrukih ili višestrukih reakcija (MRM, *engl.* *multiple reaction monitoring*), a koeficijent permeabilnosti (P_{app}), efluks, i ravnoteža mase, izračunati su prema protokolu¹⁶³.

Koeficijent permeabilnosti (P_{app}) izračunat je pomoću jednadžbe:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dT} \cdot \frac{1}{C_0} \cdot \frac{1}{A} \quad (1)$$

gdje dQ/dT predstavlja brzinu prolaska spoja, C_0 je početna koncentracija oksima i A je površina monosloja stanica ($0,7 \text{ cm}^2$).

Efluks (ER) izračunat je iz P_{app} vrijednosti sa i bez P-gp inhibitora prema jednadžbi:

$$ER = \frac{P_{app}(BA)}{P_{app}(AB)} \quad (2)$$

Ravnoteža mase (MB) izračunata je pomoću jednadžbe:

$$MB = \frac{M_d + M_r}{M_0} \quad (3)$$

gdje su M_d i M_r mase spojeva u primarnom i sekundarnom odjeljku u 60 min. M_0 je masa spoja u primarnom odjeljku na početku inkubacije. Masa oksima određena je površinom ispod vrhova grafa pomnožena s volumenom odjeljka.

3.3.10. Određivanje metaboličke razgradnje oksima u mišjim mikrosomima

Eksperimenti određivanja metaboličke stabilnosti provedeni su u suradnji s Petrom Mišetić, mag. chem. i dr. sc. Jasnom Padovan (Fidelta d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Oksimi finalne koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ u fosfatnom puferu (50 mmol dm^{-3} , pH 7,4) inkubirani su 60 minuta na 37°C zajedno s mišjim jetrenim mikrosomima (Cat.No. 452701, Batch No. 7186001, Corning, SAD) u odsustvu i prisustvu smjese koja dovodi do nastanka NADPH, a koja se sastoji od β -nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat natrijeve soli, D-glukoza-6-fosfatne kalijeve soli, glukoza-6-fosfat dehidrogenaze iz kvasca *S. cerevisiae* i magnezijevog klorida heksahidrata (svi kupljeni od Sigma-Aldrich, SAD). Metabolička aktivnost jetrenih mikrosoma je verificirana pomoću pozitivnih kontrola testosterona (*Steraloids*, SAD) i propranolola (*Sigma-Aldrich*, SAD) te negativne kontrole kofeina (*Sigma-Aldrich*, SAD)¹⁶⁴. Koncentracija oksima i kontrolnih spojeva određena je spektrometrijom masa na spektrometru Uzorci su analizirani masenim spektrometrom API 4500 Triple Quadrupole (*AB Sciex, Division of MDS Inc.*, Kanda) spojenim s Nexera X2 UHPLC (*Shimadzu*, Japan). Uzorci volumena $2 \mu\text{L}$ injektirani su na HPLC kolonu Luna Omega Polar (duljine 30 mm, unutarnjeg promjera 2,1 mm, veličine čestica 1,6 μm ; Phenomenex, Torrance, SAD) na 50°C . Za detekciju masenim spektrometrom korištena je ionizacija elektroraspršenjem uz primjenu pozitivnog potencijala s temperaturom izvora iona od 550°C te vremenom praćenja iona od 75 ms. Kvantifikacija je izvedena metodom praćenja jednostrukih ili višestrukih reakcija (MRM, engl. *multiple reaction monitoring*), a poluvrijeme metaboličke razgradnje spoja ($t_{1/2}$) izračunato je iz nagiba linearne ovisnosti koncentracije ishodnog oblika oksima o vremenu inkubacije. Normalizacijom vrijednosti prema količini proteina u inkubacijskoj smjesi iz $t_{1/2}$ je određen *in vitro* intrinzični klirens Cl_{int} spoja pomoću jednadžbe:

$$Cl_{int} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \cdot \frac{V}{m} \quad (4)$$

gdje je V predstavlja volumen krvi po inkubaciji u stvarnom sustavu, a m masu proteina po inkubaciji. Intrinzični klirens označava količinu krvi koja u minuti prođe kroz krvožilni sustav jetre gdje se spoj metabolički razgrađuje, a izražava se u $\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ jetre. Nadalje, za izračun vrijednosti predviđenog klirensa Cl koristi se jednadžba:

$$Cl = \frac{Cl_{int} \cdot A \cdot B \cdot C}{C + Cl_{int} \cdot B \cdot C} \quad (5)$$

gdje je A omjer miligrama proteina po gramu jetre, B označava omjer mase jetre i mase tijela i specifičan je za vrstu, a C je protok krvi kroz jetru ($\text{mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$) specifičan za vrstu. Relativni

hepatički klirens, *LBF*, izračunat iz omjera vrijednosti *Cl* i *C*, služio je za svrstavanje spoja u jednu od tri kategorije hepatičkog klirensa: niski ($LBF < 30\%$), umjereni ($LBF = 30 - 70\%$) ili visoki ($LBF > 70\%$) hepatički klirens.

3.4. Određivanje i analiza ciljnih staničnih meta *western blot* tehnikom

Western blot tehnikom praćena je razina fosforilacije (odnosno aktivacije ili inhibicije) specifičnih proteina određenih signalnih putova nakon tretmana stanica. Sam proces se temelji na vezanju specifičnog primarnog protutijela na protein od interesa u uzorku i detekciji istog pomoću sekundarnog obilježenog protutijela.

Za eksperiment nasadeno je 10 000 stanica po jažici na prozirne pločice s 12 jažica dva dana prije eksperimenta. Drugi dan, nakon što je aspiriran stanični medij, stanicama je dodan medij bez seruma i faktora rasta kako bi prošle fazu prilagodbe od 16 h tj. gladovanja (engl. *serum starvation*). Treći dan, nakon što je aspiriran stanični medij, u jažice su dodane otopine spojeva u staničnom mediju u LOAEL koncentracijama ukupnog volumena 500 μL po jažici. Stanice su inkubirane s otopinama oksima tijekom 60, 45, 30, 15, 5 i 0 min pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO_2 i temperaturi 37 °C). Stanice su potom na pločici isprane PBS-om te je na stanice je dodano 90 μL Leammlijevog pufera po jažici. Svaka jažica je dobro postrugana sa silionskim strugačem (engl. *scraper*) i kompletan uzorak je prebačen u novu mikroepruvetu. Potom su uzorci sonicirani pri amplitudi od 50 % i ciklusu od 0,5 s te zatim denaturirani pri 54 °C 30 min na 600 rpm te su pohranjeni na -20 °C do analize.

Uzorci su umjereni na istu koncentraciju stanica koja je nasadena u pokus, što ujedno znači i jednaku koncentraciju proteina u uzorku (potvrđeno bojanjem membranama *Ponceau S*-om). Provjerena je i konačna koncentracija proteina u svim uzorcima *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*-om (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) prema uputama proizvođača koja je iznosila 50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Uzorci su nanoseni na tvornički pripremljen *Criterion™ XT Bis-Tris Protein gel* za provođenje gel elektroforeze sa 12+2 jažice za uzorke. Svaka jažica gela isprana je 2 puta s XT MES puferom prije nanošenja uzoraka. Na gel u prvu i zadnju jažicu nanoseno 2,5 odnosno 4,5 μL markera *Full Range Rainbow™*. U ostale jažice nanoseno je 40 μL svakog uzorka za analizu. Elektroforeza proteina u uzorcima provođena je pri stalnom naponu od 200 V u sustavu

za vertikalnu elektroforezu proteina *Vertical midi-format Criterion Cell* (BioRad, SAD). Nakon što je boja bromfenol plava dosegla dno gela (oko 45 min), elektroforeza je zaustavljena.

Prije prijenosa proteina s gela na membranu, pripremljena je polivinilidenfluoridna (PVDF) membrana aktivirana u 100 %-tnom metanolu (5 s), isprana u destiliranoj vodi i namočena u transfer pufer (1 min). Prijenos proteina na membranu provodio se u transfer puferu pri stalnom naponu od 100 V tijekom 1,5 h u sustavu za transfer proteina *Criterion Cell* (BioRad, SAD). Uspješnost prijenosa proteina s gela na membranu provjerena je inkubacijom membrane u otopini boje *Ponceaus S* (4 min). Zatim je membrana odbojana u TBST puferu i destiliranoj vodi. Nakon što je dobro isprana, inkubirana je u puferu za blokiranje pri sobnoj temperaturi (1 h) uz stalno miješanje te potom ponovno isprana u TBST puferu.

Postupak je nastavljen inkubacijom membrane s primarnim protutijelima za pNF κ B, p-p38-MAPK, pACC, pSTAT3 i pERK1/2 tijekom noći pri 4°C uz stalno miješanje; ispiranjem u TBST puferu na sobnoj temperaturi (3 x 10 min), te inkubacijom s odgovarajućim sekundarnim kozjim protutijelom protiv kunićjeg imunoglobulina klase G (IgG) obilježeno enzimom peroksidazom iz hrena tijekom 1 h na sobnoj temperaturi uz stalno miješanje. Primarna i sekundarna protutijela razrijeđena su u puferu za blokiranje. Uslijedilo je ispiranje membrane u TBST puferu (3 x 10 min) te inkubacija s otopinom ECL reagensa. Detekcija kemiluminiscentnog signala imunoobojenih proteinskih vrpca zabilježena je u tamnoj kutiji s kamerom visoke rezolucije *Fusion FX System* (Vilber, Francuska) te je denzitometrijski analizirano sučeljem *Quantity 1-D Analysis Software* (Bio Rad, SAD). Intenzitet individualnih proteinskih vrpca izražen je kao arbitrarna relativna jedinica na ukupni intenzitet svih proteinskih vrpca.

3.5. *In silico* metode

3.5.1. Procjena fizikalno-kemijskih svojstava

Određivanjem fizikalno-kemijskih strukturnih karakteristika spoja *in silico* procijenjena je sposobnost prolaska testiranih oksima kroz membrane. Javno dostupno sučelje Chemicalize 2018 (*ChemAxon Ltd*, Hungary) korišteno je za određivanje sljedećih fizikalno-kemijskih parametara: molekulske mase (engl. *molecular weight*, M_r), područja polarne površine (engl. *topological polar surface area*, TPSA), broja donora i akceptora vodikovih veza (engl. *hydrogen bond donor*, HBD i *hydrogen bond acceptor*, HBA), broja veza koje se rotiraju (engl.

rotatable bonds, RB), koeficijenta lipofilnosti (logP) te koeficijenta lipofilnosti pri pH 7,4 (logD). Za sve ove parametre dane su preporuke navedene u **tablici 3.7**, a temeljene na postojećim lijekovima¹⁶⁵.

Tablica 3.7. Maksimalne granične vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstva na osnovu preporuka¹⁶⁵ potrebne za uspješan prolazak spoja kroz membrane, prvenstveno krvno-moždanu barijeru.

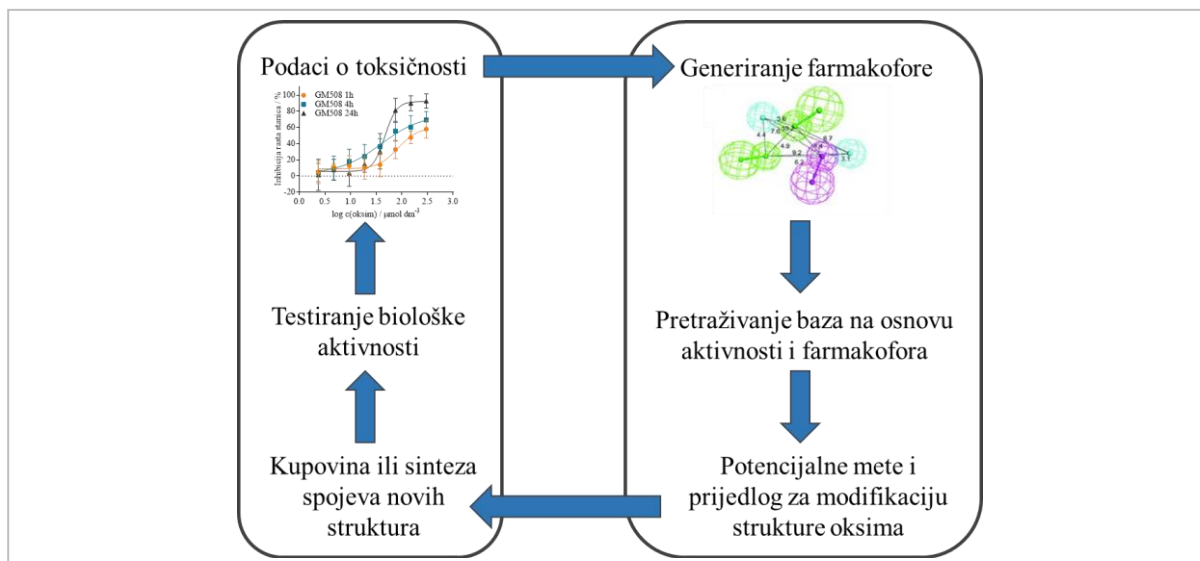
M_r / g mol ⁻¹	TPSA / Å ²	HBD	HBA	RB	logP	logD
< 450	< 60-70	< 3	< 7	< 8	< 5	< 5

3.5.2. Procjena inhibicije specifičnih enzima CYP450 sustava oksimima

Javno dostupnim sučeljem SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland)¹⁶⁶ procijenjeno je inhibiraju li testirani oksimi odabrane enzime citokrom P450 (CYP) sustava odgovornog za metabolizam ksenobiotika: CYP1A, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 i CYP3A4. Model je napravljen na temelju probnog seta od 3664 do 9272 spojeva različitih strukturnih karakteristika iz javno dostupnih baza, od kojih je za 1068 do 3000, model testiran i potvrđen. Sučelje na osnovnu usporedbe strukture spoja od interesa s spojevima poznatog djelovanja i strukture, procjenjuje inhibiciju CYP enzima.

3.5.3. Generiranje farmakofora oksima i pretraživanje 3D baza podataka

U svrhu identifikacije specifičnih staničnih meta odabranih bispiridinijevih, imidazolijevih, kinuklidinijevih, i 3-hidroksi-2-piridinskih oksima, generirani su farmakoforni modeli za svaku seriju. Farmakoforni model objašnjava kako se strukturno različiti ligandi mogu vezati na isto mjesto na proteinu te predstavlja set geometrijskih ograničenja (3D) između specifičnih funkcionalnih grupa koje omogućavaju molekuli biološku aktivnosti. U analizu su uključeni svi spojevi testirani po pojedinim serijama kroz nekoliko koraka (**slika 3.11**). Korištenjem *Common Feature Pharmacophore Generation* i *3D QSAR Pharmacophore Generation* protokola implementiranih u softverskom paketu *Biovia Discovery Studio* (verzija 18.1, Dassault Systèmes, Francuska) generirani su farmakoforni modeli na temelju seta molekula iz dane serije u kombinaciji s *in vitro* određenim aktivnostima (IC₅₀ vrijednosti na HepG2 staničnoj liniji). Na osnovu modeliranih farmakofornih modela pretražene su dostupne baze spojeva struktura poznatog djelovanja kako bi se usporedile s testiranim oksimima i time procijenile potencijalne mete djelovanja oksima odgovorne za njihov toksični mehanizam djelovanja na razini stanice.



Slike 3.11. Tok prikupljana podataka i analize tijekom procjene potencijalnih novih meta djelovanja.

3.6. Instrumenti korišteni za potrebna mjerenja

Spektrofotometrijska i fluorescencijska mjerenja provedena su na čitačima mikrotitarskih pločica Infinite M200PRO (Tecan Group Ltd., Švicarska), Victor³ (PerkinElmer, SAD), Spark® (Tecan Austria GmbH, Austrija) i SynergyMx (BioTek Instruments, SAD).

Za specifično određivanje aktivacije programirane stanične smrti i oštećenja molekula DNA korišten je Guava® Muse® Cell Analyzer (Luminex Corporation, SAD) baziran na protočnoj citometriji.

TC20™ Automated Cell Counter (BioRad, SAD) korišten je za određivanje broja živih i mrtvih stanica u uzorku.

Za određivanje pH vrijednosti pufera, korišten je pH-metar SevenEasy pH s InLab® 413 elektrodom (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska).

Za detekcija kemiluminiscentnog signala imunoobojenih proteinskih vrpce korištena je tamna kutija s kamerom visoke rezolucije Fusion FX System (Vilber, Francuska)

Za denzitometrijsku analizu proteinskih vrpce korišten je Quantity 1-D Analysis Software (Bio Rad, SAD).

Za *in silico* analize fizikalno – kemijskih karakteristika oksima, procjene inhibicije CYP enzima te generiranje farmakofora oksima korišteni su programi Chemicalize (ChemAxon, Mađarska), SwissADME (Molecular Modeling Group of the Swiss Institute of Bioinformatics, Švicarska) i Discovery Studio Client (verzija18.1, Dassault Systèmes, Francuska).

3.7. Statističke analize

Statističke analize provedene su u programu Prism (verzija 8, *GraphPad Software*, SAD). Korištena je jednosmjerna ANOVA s višestrukim usporedbama ($\alpha = 0,05$) radi provjere razlike među skupinama: Bonferronijevim testom (određivanje integriteta membrane, $n = 4 - 6$), Dunettovim (aktivacija apoptoze, $n = 6$, oštećenja molekula DNA $n = 6$ i toksičnost kombinacijom spojeva, $n = 6$, detekcija specifičnih proteina *western blot* tehnikom, $n = 4$), Holm-Sidakovim (određivanje aktivacije ROS-a, $n = 6$ i antioksidacijskog potencijala, $n = 6$), nekorigiranim Fisherovim LSD testom (određivanje aktivnosti kaspaza, $n = 8$). Statistička značajnost prikazana je na sljedeći način: & $p < 0,05$; # $p < 0,001$; \$ $p < 0,005$; * $p < 0,0001$.

§ 4. REZULTATI

4.1. Citotoksični učinak oksima na odabrane stanice

4.1.1. Toksičnost odabranih oksima nakon izloženosti stanica u trajanju od 24 sata

Vrijednosti IC_{50} odabranih serija oksima, odnosno vrijednosti pri kojima se inhibira rast 50 % stanica, određene su praćenjem vijabilnosti stanica nakon izloženosti u trajanju od 24 sata. Vrijednosti su određene iz krivulja ovisnosti postotka živih stanica o logaritmu testiranog koncentracijskog raspona oksima. Dobiveni rezultati sumirani su u **tablici 4.1 – 4.5** za svaku pojedinu skupinu testiranih oksima. Vrijednosti IC_{50} za pojedini oksim nisu se značajno razlikovale ovisno o vrsti i tipu stanica, uz par izuzetaka koji su navedeni kasnije u rezultatima.

Testirani bispiridinijevi oksimi predstavljaju povezanu seriju struktura koja se razlikuje u duljini i izgledu lanca između dva prstena te supstituentima na samim prstenovima. Većina testiranih bispiridinijevih oksima nije bila citotoksična u testiranom koncentracijskom rasponu do $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Uočena je citotoksičnost jedino bispiridinijevih oksima K867 i K870 s but-2-enskom poveznicom i jednim odnosno dva atoma klorova supstituenta na jednom piridinijevom prstenu (**tablica 4.1**). Iako se toksičnost nije značajno razlikovala ovisno o tipu stanice, živčane SH-SY5Y su se pokazale najosjetljivijima na djelovanje oba navedena bispiridinijeva oksima. Nadalje, značajno povećanje toksičnosti od 4 – 12 puta uočeno je dodatkom drugog atoma klora na piridinijev prsten kao u slučaju spoja K870 kod svih tipova stanica.

Tablica 4.1. IC₅₀ vrijednosti (μmol dm⁻³) bispiridinijevih oksima nakon izloženosti stanica u trajanju od 24 sata. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti (± standardna pogreška). Parametri su određeni iz najmanje tri zasebna pokusa.

Oksim	SH-SY5Y	Mioblasti	Miotubuli	HepG2	HEK293	HK-2
K027	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
K865	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
K868	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
TMB-4	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
K048	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
K866	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
K869	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
K074	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
K203	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
K867	148 ± 1,10	156 ± 1,07	244 ± 1,15	299 ± 1,11	218 ± 24,1	188 ± 1,13
K870	13,1 ± 1,41	27,9 ± 1,08	19,2 ± 1,13	46,6 ± 1,12	26,07 ± 1,10	47,1 ± 5,31
K075	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800

^a n – vrijednosti koje nisu određene; ≥ – IC₅₀ vrijednosti zapisane su kao približna vrijednost, zbog nepostizanja maksimuma (*platoa*) toksičnog profila krivulje, bez kojeg se ne može odrediti točna brojčana vrijednost inhibicije. Maksimum profila bi se postigao u tretmanima pri znatno većim koncentracijama od testiranih (većima od 800 μmol dm⁻³).

Testirani imidazolijski oksimi strukturno su se razlikovali po pobočnom ogranku na imidazolijskom prstenu. Oksimi s butilnim (IV) i but-3-enilnim (VI) supstituentom nisu uzrokovali značajnu toksičnost u testiranom koncentracijskom rasponu (do 800 μmol dm⁻³) na većini testiranih stanica. Kod stanica gdje je uočeno toksično djelovanje, HepG2 i HEK293, IC₅₀ vrijednosti procijenjene su na koncentracije oko 300 μmol dm⁻³ ili više, što je znatno više od doza koje bi se primijenile u *in vivo* terapiji^{28,85}. Nasuprot tome, uvođenje aromatskog supstituenta u strukturu imidazolijskih oksima kao kod VII (4-klorbenzil supstituent) i X (metilbenzil supstituent) povećalo je negativni učinak na stanice. Ovi oksimi su bili toksični na sve testirane tipove stanica, s IC₅₀ vrijednostima u rasponu od 111 – 321 μmol dm⁻³. U slučaju ovih imidazolijskih oksima najosjetljivijima su se pokazale mišićne stanice.

Tablica 4.2. IC₅₀ vrijednosti (μmol dm⁻³) imidazolijevih oksima nakon izloženosti stanica u trajanju od 24 sata. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti (± standardna pogreška). Parametri su određeni iz najmanje tri zasebna pokusa.

Oksim	SH-SY5Y	Mioblasti	Miotubuli	HepG2	HEK293	HK-2
IV	≥ 800	≥ 400	≥ 500	≥ 300	300 ± 5,01	≤ 800
VI	≥ 800	≥ 400	≥ 500	≥ 300	270 ± 4,51	≤ 630
VII	321 ± 1,05	111 ± 1,05	119 ± 1,08	212 ± 1,10	189 ± 1,09	226 ± 1,09
X	273 ± 1,05	119 ± 1,14	143 ± 1,13	187 ± 1,31	160 ± 1,12	231 ± 1,07

≥ ili ≤ – IC₅₀ vrijednosti zapisane su kao približna vrijednost, zbog nepostizanja maksimuma (*platoa*) toksičnog profila krivulje, bez kojeg se ne može odrediti točna brojčana vrijednost inhibicije. Maksimum profila bi se postigao u tretmanima pri znatno većim koncentracijama od testiranih (većima od 300, 400, 500 ili 800 μmol dm⁻³).

Kinuklidinijeva serija oksima razlikovala se prema jednom supstituentu na kinuklidinijevoj jezgri. Od ove serije spojeva, toksičnost je pokazao jedino Q5 s dugim dodecil-alkilnim lancem (C12) na svim testiranim stanicama (25,8 – 197 μmol dm⁻³), od kojih su SH-SY5Y bile najmanje osjetljive. Spojevi s kraćim lancima (C1, C3 i C4) ili s prisutnim benzilnim supstituentom (Q6) nisu utjecali na citotoksičnost kao niti dodatak dodatnih supstituenata (Q7 – Q14) na benzil u *meta* ili *para* položaju (brom, klor, metil ili nitro skupina).

Tablica 4.3. IC₅₀ vrijednosti (μmol dm⁻³) kinuklidinijevih oksima nakon izloženosti stanica u trajanju od 24 sata. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti (± standardna pogreška). Parametri su određeni iz najmanje tri zasebna pokusa.

Oksim	SH-SY5Y	Mioblasti	Miotubuli	HepG2	HEK293	HK-2
Q1	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
Q2	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
Q3	≥ 800	-	-	≥ 800	-	-
Q4	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
Q5	147 ± 1,10	41,0 ± 1,05	61,0 ± 1,15	25,8 ± 1,27	37,0 ± 1,19	64,7 ± 1,10
Q6	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
Q7	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
Q8	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
Q9	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
Q10	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
Q11	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
Q12	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
Q13	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
Q14	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a

^a n – vrijednosti koje nisu određene; ≥ – IC₅₀ vrijednosti zapisane su kao približna vrijednost, zbog nepostizanja maksimuma (*platoa*) toksičnog profila krivulje, bez kojeg se ne može odrediti točna brojčana vrijednost inhibicije. Maksimum profila bi se postigao u tretmanima pri znatno većim koncentracijama od testiranih (većima od 800 μmol dm⁻³).

Četvrta testirana serija oksima bila je 3-hidroksi-2-piridiniska, serija bez pozitivnog naboja u strukturi tj. s tercijarnim dušikovim atomom umjesto kvaternog. Vrijednosti iz **tablice 4.4** upućuju da značajnu citotoksičnost iz navedene serije nisu uzrokovali oksimi jednostavnije strukture JR585, JR595 i RM048. Značajna toksičnost zabilježena je kod oksima s hidroizokinolinskim pobočnim ogrankom tj. GM415, GM113 i GM508. Vrijednosti koje se ističu ovisno o tipu stanica su: za GM113, na kojeg su najmanje osjetljive primarne mišićne i HK-2 stanice; te za GM415, na kojeg su najosjetljiviji mioblasti. Iz ove serije oksima, oksim GM508 je izdvojen kao najtoksičniji neovisno o tipu stanica.

Tablica 4.4. IC₅₀ vrijednosti (μmol dm⁻³) 3-hidroksi-2-piridinskih oksima nakon izloženosti stanica u trajanju od 24 sata. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti (± standardna pogreška). Parametri su određeni iz najmanje tri zasebna pokusa.

Oksim	SH-SY5Y	Mioblasti	Miotubuli	HepG2	HEK293	HK-2
JR585	513 ± 5,86	≥ 800	≥ 800	533 ± 1,64	490 ± 1,22	≥ 800
JR595	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	n ^a	n ^a
RM048	≥ 500	n ^a	n ^a	≥ 500	n ^a	n ^a
GM415	154 ± 1,07	7,73 ± 0,81	309 ± 1,13	152 ± 1,61	127 ± 2,49	299 ± 3,44
GM113	44,4 ± 1,06	≥ 300	≥ 300	26,9 ± 1,11	12,5 ± 1,13	≥ 300
GM508	46,7 ± 1,1	41,0 ± 1,05	93,3 ± 1,13	23,0 ± 1,06	48,9 ± 1,08	86,5 ± 1,15

^a n – vrijednosti koje nisu određene; ≥ – IC₅₀ vrijednosti zapisane su kao približna vrijednost, zbog nepostizanja maksimuma (*platoa*) toksičnog profila krivulje, bez kojeg se ne može odrediti točna brojčana vrijednost inhibicije. Maksimum profila bi se postigao u tretmanima pri znatno većim koncentracijama od testiranih (većima od 500 ili 800 μmol dm⁻³).

Nadalje, određena je i vijabilnost stanica izloženih referentnim oksimima i kontrolnim spojevima poznatog djelovanja (**tablica 4.5**). Citotoksični učinak referentnih oksima 2PAM, HI-6 i LüH-6 nije uočen ni za jednu staničnu liniju u testiranom koncentracijskom rasponu. Izuzetak je bio oksim Hlō-7 koji unutar strukture ima tri oksimske skupine⁷⁸ i koji je pokazao negativno djelovanje na HepG2 i HEK293 stanice, ali tek pri višim testiranim koncentracijama.

Kontrolni spoj atrakurij besilat (AB), nikotinski antagonist, pokazao je toksičnost u testiranom koncentracijskom rasponu, međutim, vrijednosti IC₅₀ su znatno više od onih korištenih u medicinskoj praksi¹⁶⁷. Poznati induktor apoptoze, staurosporin (SS), prema očekivanju bio je najtoksičniji testirani kontrolni spoj, i to u nanomolarnom području, dok živčani prijenosnik acetilkolin (ACh), kao i odobreni alkaloidni lijek atropin (At), nisu bili citotoksični u testiranom koncentracijskom rasponu.

Tablica 4.5. IC₅₀ vrijednosti (μmol dm⁻³) referentnih oksima i kontrolnih spojeva nakon izloženosti stanica u trajanju od 24 sata. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti (± standardna pogreška). Parametri su određeni iz najmanje tri zasebna pokusa.

Spoj	SH-SY5Y	Mioblasti	Miotubuli	HepG2	HEK293	HK-2
2-PAM	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
HI-6	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
LüH-6	≥ 800	n ^a	n ^a	≥ 800	≥ 800	≥ 800
HIö-7	≥ 800	n ^a	n ^a	683 ± 1,60	291 ± 1,10	≥ 800
AB	67,7 ± 1,07	122 ± 1,03	69,2 ± 1,06	224 ± 1,06	53,3 ± 1,04	170 ± 1,21
SS	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,001	> 2	0,02 ± 0,001	≤ 0,015
At	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
ACh	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800

^a n – vrijednosti koje nisu određene; ≥ – IC₅₀ vrijednosti zapisane su kao približna vrijednost, zbog nepostizanja maksimuma (*platoa*) toksičnog profila krivulje, bez kojeg se ne može odrediti točna brojčana vrijednost inhibicije. Maksimum profila bi se postigao u tretmanima pri znatno većim koncentracijama od testiranih (većima od 2 ili 800 μmol dm⁻³).

Analizom rezultata testiranih serija oksima izdvojeni su kandidati iz svake skupine oksima za daljnja testiranja na temelju njihove citotoksičnosti: K867 i K870 (bispiridinijevi); VII i X (imidazolijski); Q5 (kinuklidinijev) i GM415, GM113 i GM508 (3-hidroksi-2-piridinski).

4.1.2. Toksičnost odabranih oksima nakon izloženosti stanica u trajanju od 1 i 4 sata

Ispitana je toksičnost odabranih oksima u odnosu na njihovu koncentraciju i vrijeme izloženosti stanica (**slika 4.1**). U **tablici 4.6** i **tablici 4.7** prikazane su dobivene IC₅₀ vrijednosti nakon izloženosti stanica u trajanju od 1 i 4 sata.

U slučaju odabranih bispiridinijevih oksima, za oksim s jednim atomom klora K867, uočena je netoksičnost u testiranom području, kod svih tipova stanica. Isti učinak smanjenja toksičnosti u testiranom području zamječen je kod i kod 3-hidroksi-2-piridinskih oksima s hidroizokinolinskim pobočnim ogrankom i to kako slijedi: za GM415 i GM113 kod živčanih, mišićnih, jetrenih te bubrežnih stanica, za GM508 kod mišićnih, jetrenih i bubrežnih stanica odraslih HK-2 (**tablica 4.1** i **tablica 4.4**). S druge strane, imidazolijski i kinuklidinijevi oksimi su već unutar 4 sata pokazali značajnu citotoksičnost u rasponu od 65 – 531 μmol dm⁻³. Kao najtoksičniji oksim u 4 sata izdvaja se bispiridinijev oksim s dva klorova supstituenta, K870 (**tablica 4.6**).

Tablica 4.6. IC₅₀ vrijednosti (μmol dm⁻³) odabranih oksima nakon izloženosti stanica u trajanju od 4 sata.. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti (± standardna pogreška). Parametri su određeni iz najmanje tri zasebna pokusa.

Oksim	SH-SY5Y	Mioblasti	Miotubuli	HepG2	HEK293	HK-2
K867	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
K870	23,9 ± 1,17	89,1 ± 1,15	19,2 ± 1,32	105 ± 1,13	62,2 ± 1,09	100 ± 1,08
VII	467 ± 1,01	306 ± 1,06	178 ± 1,1	398 ± 3,97	278 ± 1,13	288 ± 1,10
X	408 ± 1,01	302 ± 1,21	166 ± 1,08	417 ± 1,04	231 ± 1,31	324 ± 1,09
Q5	174 ± 1,17	185 ± 1,1	107 ± 1,18	219 ± 1,16	65,0 ± 1,12	141 ± 1,32
GM415	≤ 500	≥ 500	380 ± 26,9	≥ 500	200 ± 1,27	≥ 500
GM113	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	20,5 ± 1,15	≥ 300
GM508	74,1 ± 1,29	≥ 300	≥ 300	≥ 300	49,7 ± 1,15	≥ 300

≥ ili ≤ – IC₅₀ vrijednosti zapisane su kao približna vrijednost, zbog nepostizanja maksimuma (*platoa*) toksičnog profila krivulje, bez kojeg se ne može odrediti točna brojčana vrijednost inhibicije. Maksimum profila bi se postigao u tretmanima pri znatno većim koncentracijama od testiranih (većima od 300, 500 ili 800 μmol dm⁻³).

Nakon izloženosti stanica oksimima u trajanju od 1 sata, očekivan je sličan toksični učinak prvenstveno bispiridinijevih i 3-hidroksi-2-piridinskih oksima (**slika 4.1**), što je i potvrđeno na većini testiranih stanica (**tablica 4.7.**). Imidazolijevi i kinuklidinijevi oksimi, i unutar 1 sata pokazali su značajnu citotoksičnost u rasponu od 190 – 531 μmol dm⁻³ (**tablica 4.7.**). Kao najtoksičniji izdvaja se bispiridinijev oksim GM508.

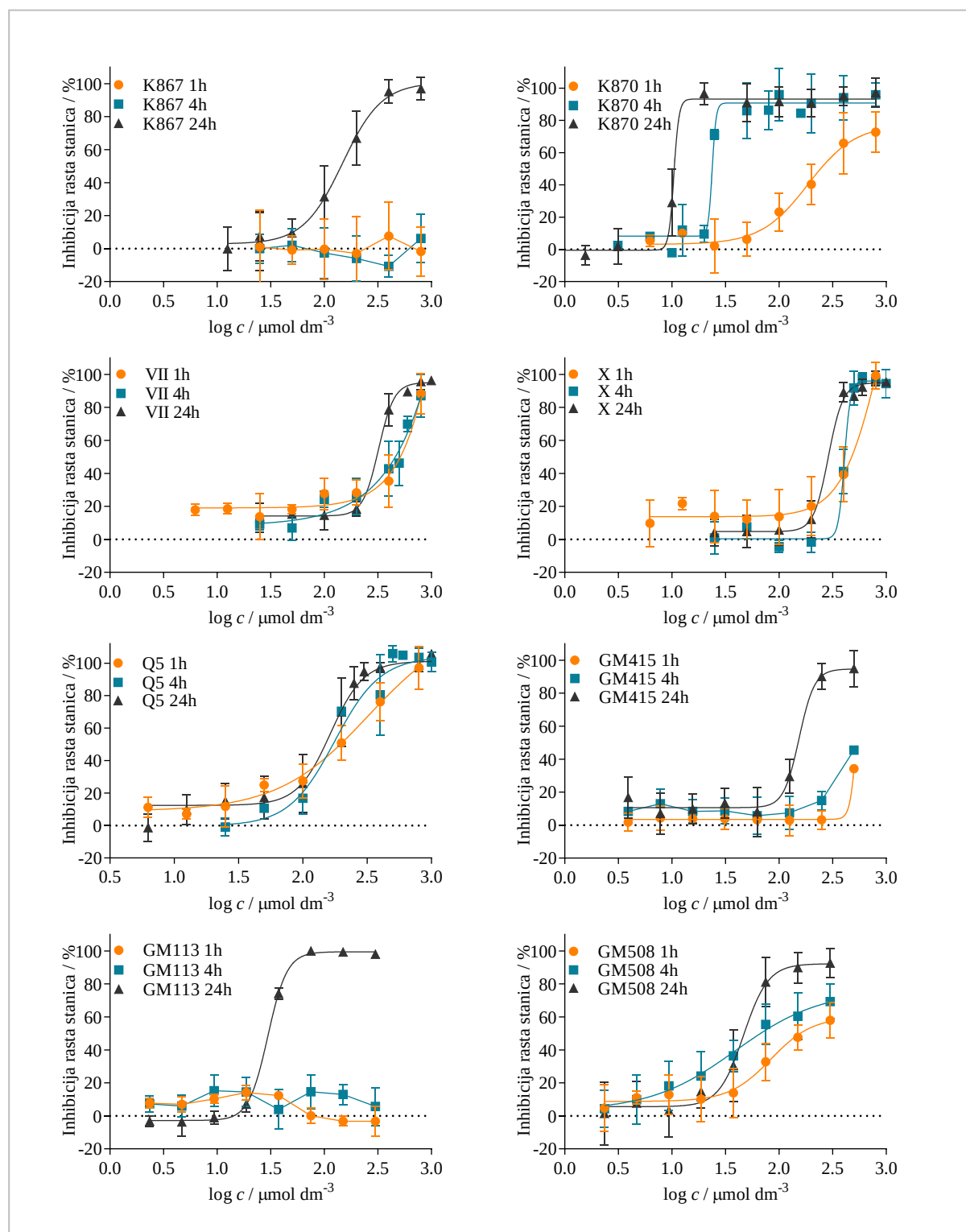
Tablica 4.7. IC₅₀ vrijednosti (μmol dm⁻³) odabranih oksima nakon izloženosti stanica u trajanju od 1 sata.. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti (± standardna pogreška). Parametri su određeni iz najmanje tri zasebna pokusa.

Oksim	SH-SY5Y	Mioblasti	Miotubuli	HepG2	HEK293	HK-2
K867	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800	≥ 800
K870	186 ± 1,25	≥ 800	≥ 800	≤ 800	161 ± 1,12	≥ 800
VII	549 ± 1,01	708 ± 38,7	631 ± 8,2	603 ± 4,12	461 ± 4,66	724 ± 6,32
X	525 ± 1,01	631 ± 2,09	575 ± 3,52	≤ 800	394 ± 1,14	661 ± 1,9
Q5	209 ± 1,62	355 ± 1,3	437 ± 3,26	313 ± 1,08	190 ± 6,02	427 ± 6,76
GM415	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	215 ± 1,26	≥ 500
GM113	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	33,0 ± 1,12	≥ 300
GM508	83,87 ± 1,2	≥ 300	≥ 300	≥ 300	69,0 ± 1,11	≥ 300

≥ ili ≤ – IC₅₀ vrijednosti zapisane su kao približna vrijednost, zbog nepostizanja maksimuma (*platoa*) toksičnog profila krivulje, bez kojeg se ne može odrediti točna brojčana vrijednost inhibicije. Maksimum profila bi se postigao u tretmanima pri znatno većim koncentracijama od testiranih (većima od 300 ili 500 μmol dm⁻³).

Na **slici 4.1** dan je prikaz rezultata inhibicije rasta SH-SY5Y stanica u ovisnosti o koncentraciji odabranog oksima i vremenu izloženosti. Iz prikaza se može primjetiti sličan citotoksični profil imidazolijevih i kinuklidinijevih oksima koji ne ovisi o vremenu i koncentraciji. Nasuprot tome citotoksičnost bispiridinijevih i 3-hidroksi-2-piridinskih oksima je vremenski i koncentracijski ovisna i pokazuje dva različita profila: jedan kod oksima K867, GM415 i GM113, a drugi kod

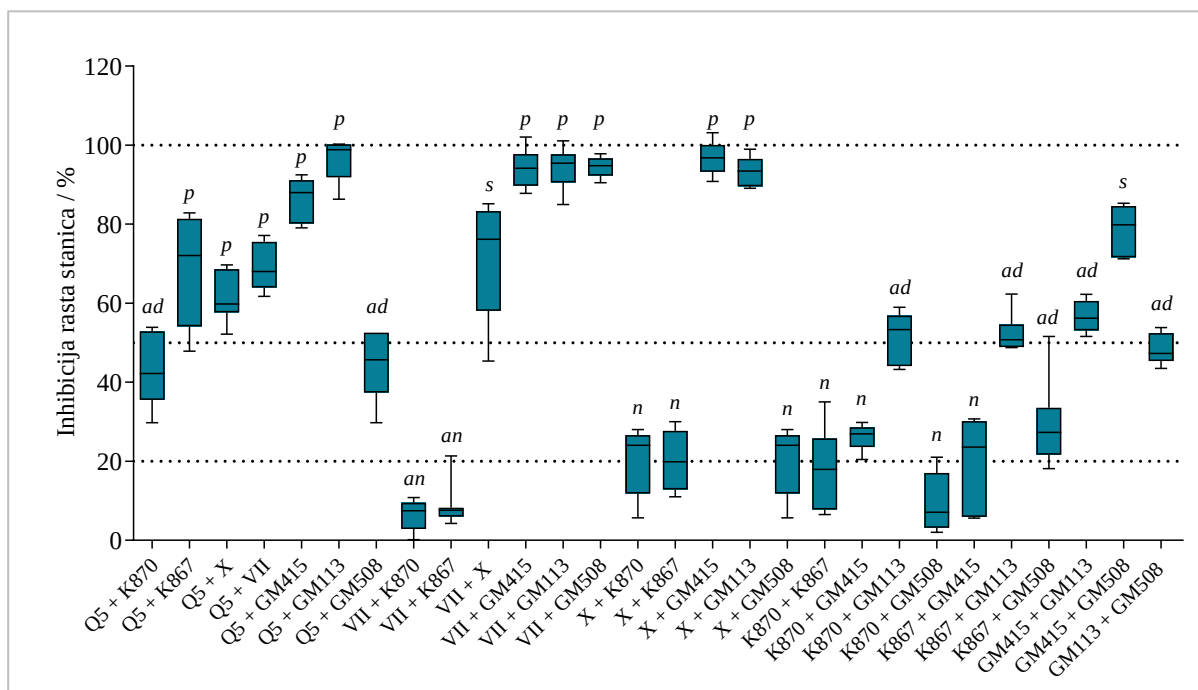
oksima K870 i GM508. Prema ovim rezultatima za daljnje ispitivanje detaljnog mehanizma citotoksičnosti, odabrane su koncentracije oksima koje će pokrenuti mehanizam toksičnosti i uzrokovati smrt stanice u 24 sata. Odnosno, za daljnja testiranja odabrana je vremenska točka od 4 sata i koncentracija svakog oksima koja inhibira do 20 – 25 % rasta stanica ($\approx IC_{20-25}$) odnosno tzv. LOAEL doza (engl. *Low Observed Adverse Effect Level*).



Slika 4.1. Inhibicija staničnog rasta (%) živčanih stanica (SH-SY5Y) uslijed vremenski- i koncentracijski-ovisnog tretmana odabranim oksimima. Vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška) iz eksperimentalno dobivenih vrijednosti inhibicije rasta stanica u 1, 4 i 24 sata. Parametri su određeni iz najmanje tri zasebna pokusa.

4.1.3. *Odgovor stanice na djelovanje kombinacije dva odabrana oksima*

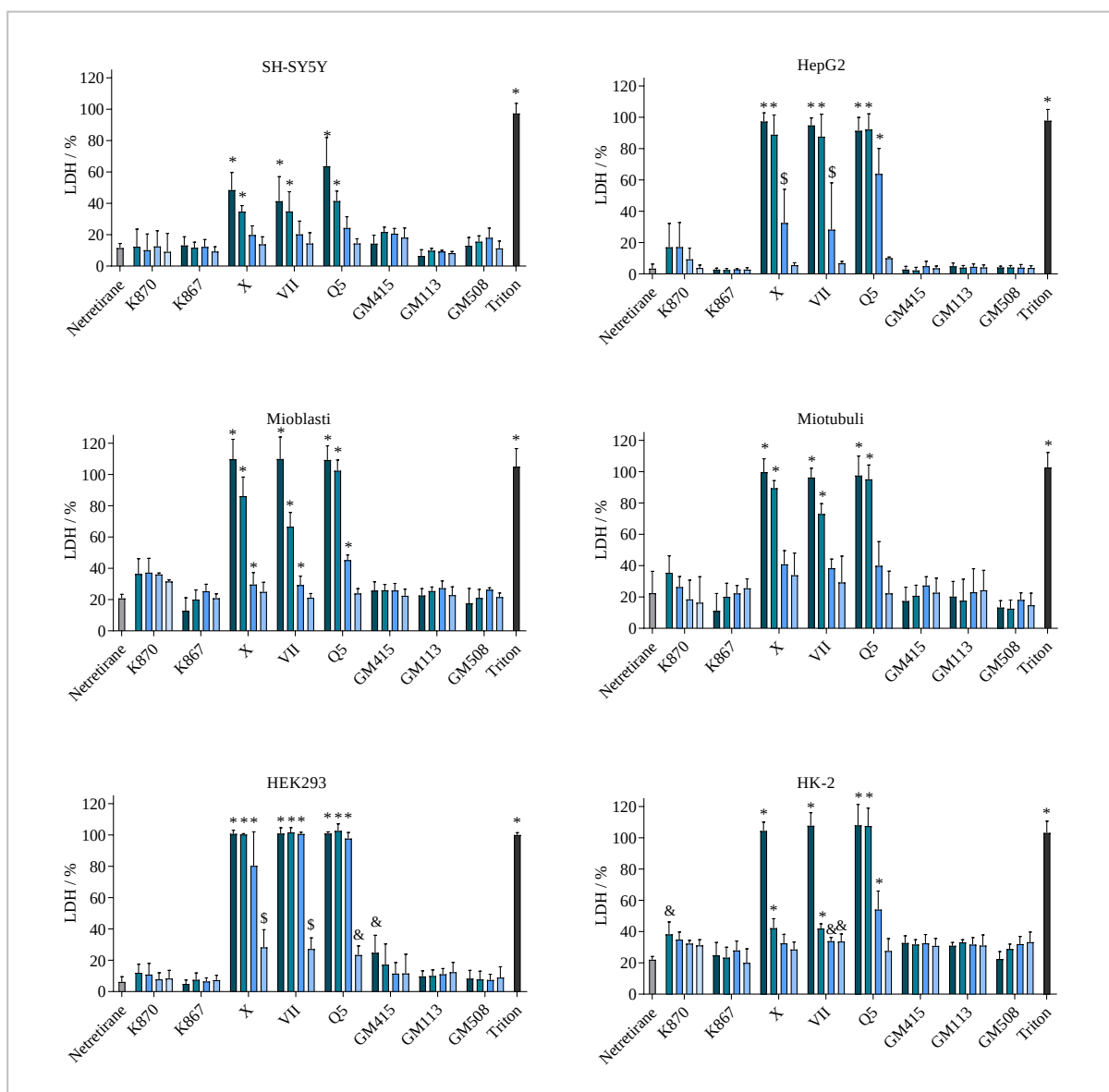
Učinkovitost oksima u reaktivaciji AChE inhibirane s različitim OP-ima nije univerzalna te se razmatra kombinacija dva ili više oksima u terapiji kod trovanja. Stoga izloženost stanica kombinaciji dva spoja može pružiti uvid u potencijalni mehanizam njihovog djelovanja i ukazati na sinergistički, potencijski, aditivni ili antagonistički¹³² učinak. Tipovi djelovanja se razlikuju prema odnosu ukupnog toksičnog učinka kombinacije spoja i njihovog individualnog djelovanja. Tako je kod sinergističkog i potencijskog djelovanja toksični učinak kombinacije spojeva znatno veći, kod adicijskog jednak, a kod antagonističkog djelovanja znatno manji u odnosu na očekivanu toksičnost određenu prema aritmetičkom zbroju toksičnosti svakog testiranog spoja zasebno. Za testiranje kombinacije oksima i procjenu tipa djelovanja, odabrane su živčane stanice SH-SY5Y i toksični oksimi: K867 i K870 (bispiridinijevi); VII i X (imidazolijski); Q5 (kinuklidinijev) te GM415, GM113 i GM508 (3-hidroksi-2-piridinski) u LOAEL koncentraciji. Dobiveni rezultati prikazani su na **slici 4.2**. Kao što je očekivano, procijenjeno je da većina oksima u testiranim koncentracijama djeluju aditivnim učinkom (**slika 4.2**). Rezultati ukazuju da bi imidazolijski oksimi (VII u kombinaciji s X) i 3-hidroksi-2-piridinski oksimi (GM415 u kombinaciji s GM508) (**slika 4.2**), mogli djelovati sinergistički u biološkom sustavu zbog znatno veće sumarne toksičnosti od njihovog individualnog djelovanja. Ostale kombinacije oksima prema rezultatima imaju moguće potencijsko djelovanje. Jedino u slučaju kombinacije imidazolijskih oksima VII i bispiridinijevih oksimima moglo bi doći do njihovog antagonizma.



Slika 4.2. Utjecaj kombinacije oksima na inhibiciju staničnog rasta živčanih stanica (SH-SY5Y) nakon 4-satnog tretmana (% u odnosu na netretirane stanice): **K870** ($15 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** ($400 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** ($200 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** ($250 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** ($100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** ($350 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** ($300 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Procijenjeni tip djelovanja: *ad* (aditivan), *an* (antagonistički), *n* (bez međudjelovanja), *p* (potencijski), i *s* (sinergistički). Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa.

4.2. Integritet membrane stanica nakon izloženosti oksimima

Utjecaj izloženosti stanica odabranim oksimima u trajanju od 4 h na integritet membrane stanica, praćen je neposredno pomoću aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) koja je ispuštena iz stanice u medij. Odabrani su svi tipovi stanica za koje je utvrđena citotoksičnost oksima u visokoj koncentraciji, a dobiveni rezultati prikazani su na **slici 4.3**. Iz prikaza može se uočiti da imidazolijevi oksimi VII i X te kinuklidinijev Q5 uzrokuju statistički značajno otpuštanje LDH u medij odnosno pod njihovim djelovanjem mijenja se integritet stanične membrane. Nasuprot tome, ostali oksimi ne utječu na integritet membrane (izuzev najviših koncentracija K867 na HK-2 i GM415 na HEK293).

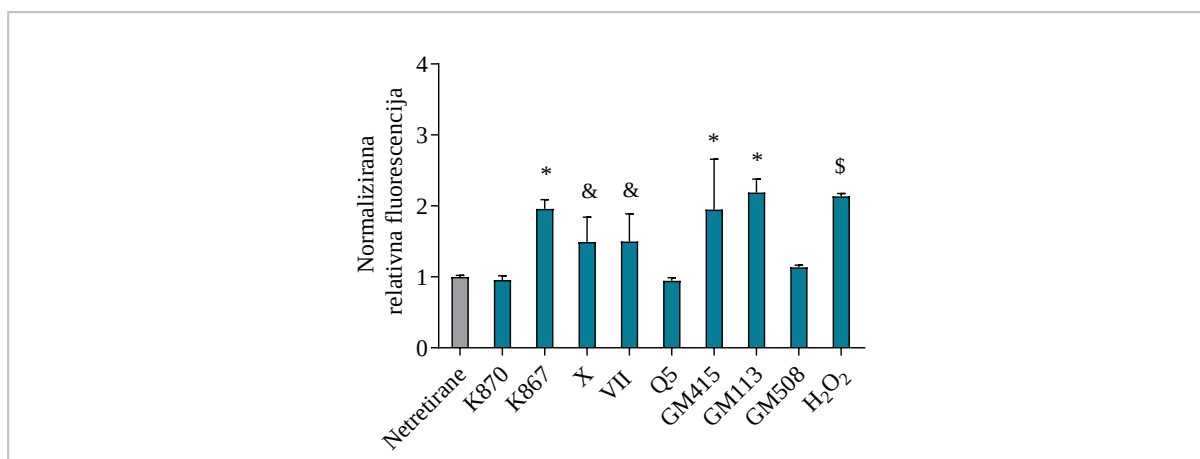


Slika 4.3. Postotak ispuštenog LDH u medij odabranih staničnih linija nakon tretmana u trajanju od 4 h odabranim oksimima (u odnosu na netretirane stanice) u serijskom razrjeđenju (stupci s lijeva na desno, od najviše do najniže naznačene koncentracije): **K870** (50 – 400 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** (100 – 800 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** (100 – 800 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** (100 – 800 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** (100 – 800 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** (62,5 – 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** (37,5 – 300 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** (37,5 – 300 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) i **Triton** (pozitivna kontrola, 0,18 %). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje dva pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: &p < 0,05; \$p < 0,001; *p < 0,0001.

4.3. Oksidacijski stres u stanicama izloženih oksimima

4.3.1. Indukcija oksidacijskog stresa u stanicama

Oksidacijski stres kao jedan od mogućih uzročnika toksičnosti, odnosno smrti stanice, opisan je praćenjem prisutnosti reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen speceis*, ROS) nakon izloženosti stanica SH-SY5Y odabranim oksimima u trajanju od 4 h. Za testiranje su korištene LOAEL koncentracije oksima koje se nisu pokazale toksičnima u 4 sata, a rezultati su prikazani na **slici 4.4**. Oksimi K867, VII, X, GM415 i GM113 uzrokovali su statistički značajnu indukciju oksidacijskog stresa (**slika 4.4**). Također, može se primjetiti da unutar skupine 3-hidroksi-2-piridinskih oksima, GM508 nije inducirao oksidacijski stres. Uz to, dodatni drugi klorov supstituent na bispiridinijevom oksimu K870 smanjio je utjecaj na indukciju reaktivnih kisikovih vrsta u usporedbi s K867.

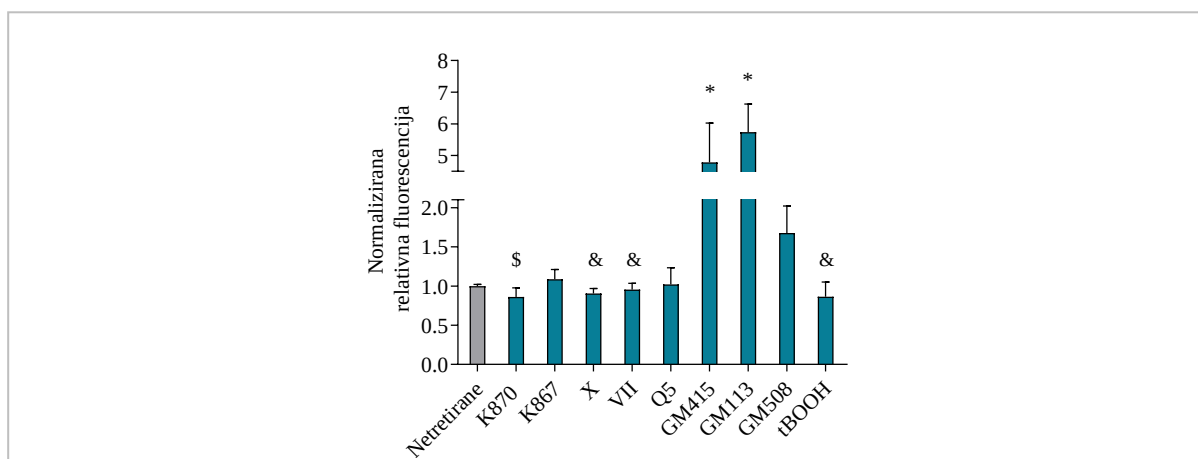


Slika 4.4. Indukcija reaktivnih kisikovih vrsta nakon 4-satnog tretmana živčanih stanica (SH-SY5Y) odabranim oksimima: **K870** ($15 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** ($400 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** ($200 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** ($250 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** ($100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** ($350 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** ($300 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i **H₂O₂** ($100 \mu\text{mol dm}^{-3}$). H₂O₂ je korišten kao pozitivna kontrola. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: &p < 0,05; \$p < 0,005; *p < 0,0001.

4.3.2. Promjena razine glutationa u stanicama

U slučaju povećanja reaktivnih kisikovih vrsta stanica aktivira antioksidacijsku obranu kako bi se direktno ili indirektno spriječila staničnu smrt. Aktivacija antioksidacijskog potencijala praćena je mjerenjem prisutnosti glutationa (GSH) u SH-SY5Y stanicama izloženima istim koncentracijama oksima kao i pri mjerenju indukcije oksidacijskog stresa. Pokazalo se da je potrošnja GSH bila statistički značajno inducirana nakon izloženosti bispiridinijevom oksimu K870 te imidazolijevim oksimima VII i X (**slika 4.5**), no biološki gledano, razlika u odnosu na

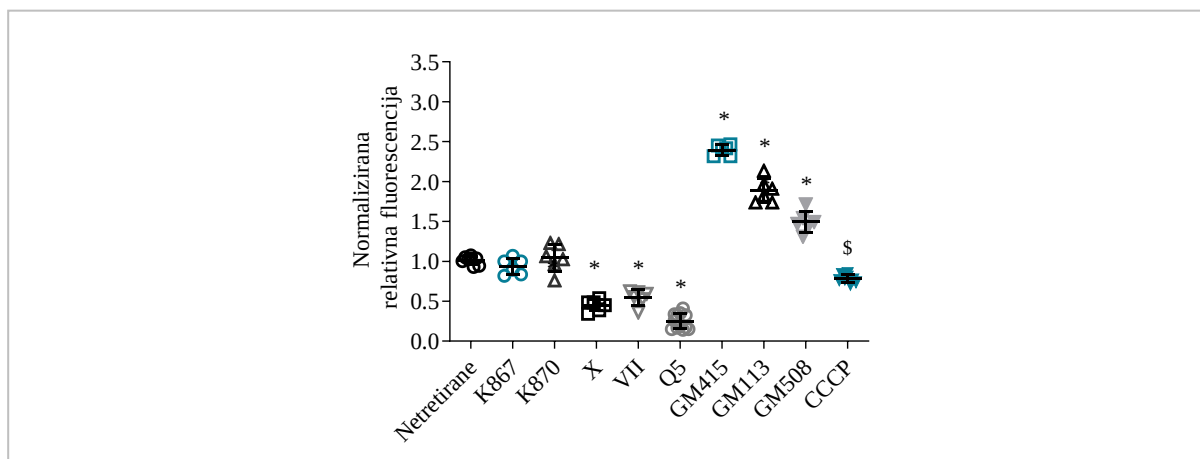
netretirane stanice je samo 1,2 puta te bi to bilo potrebno dodatno ispitati. U prisutnosti 3-hidroksi-2-piridinskih oksima, GM415 i GM113 (**slika 4.5**) primijećena je povećana razina nereduciranog GSH što bi moglo značiti da stanice prolaze adaptivni mehanizam i moguće je da je došlo do pojačane sinteze GSH.



Slika 4.5. Indukcija antioksidacijske obrane stanice nakon 4-satnog tretmana živčanih stanica (SH-SY5Y) odabranim oksimima: **K870** (15 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** (400 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** (200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** (250 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** (100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** (350 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** (300 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** (50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **tBOOH** (100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). tBOOH je korišten kao pozitivna kontrola. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: &p < 0,05; \$p < 0,005; *p < 0,0001.

4.4. Mitohondrijski membranski potencijal ($\Delta\Psi_m$)

Mitohondrijski membranski potencijal ($\Delta\Psi_m$) je neophodna komponenta procesa stvaranja energije u stanici procesom oksidacijska fosforilacije. Povećanje ili smanjenje $\Delta\Psi_m$ može uzrokovati neželjene promjene u stanicama popraćene raznim patologijama zbog svoje uloge u homeostazi stanica. Zbog toga su praćene promjene membranskog potencijala u SH-SY5Y stanicama izloženim odabranim oksimima iz testnih skupina pri LOAEL koncentracijama. Dobiveni rezultati prikazani su na **slici 4.6**. Imidazolijski oksimi VII i X te kinuklidinijski oksim Q5 uzrokovali su smanjenje membranskog potencijala, dok su 3-hidroksi-2-piridinski oksimi GM415, GM113 i GM508 potaknuli značajno povećanje membranskog potencijala. Klorirani bispiridinijski oksimi K867 i K870 nisu uzrokovali promjene membranskog potencijala mitohondrija.

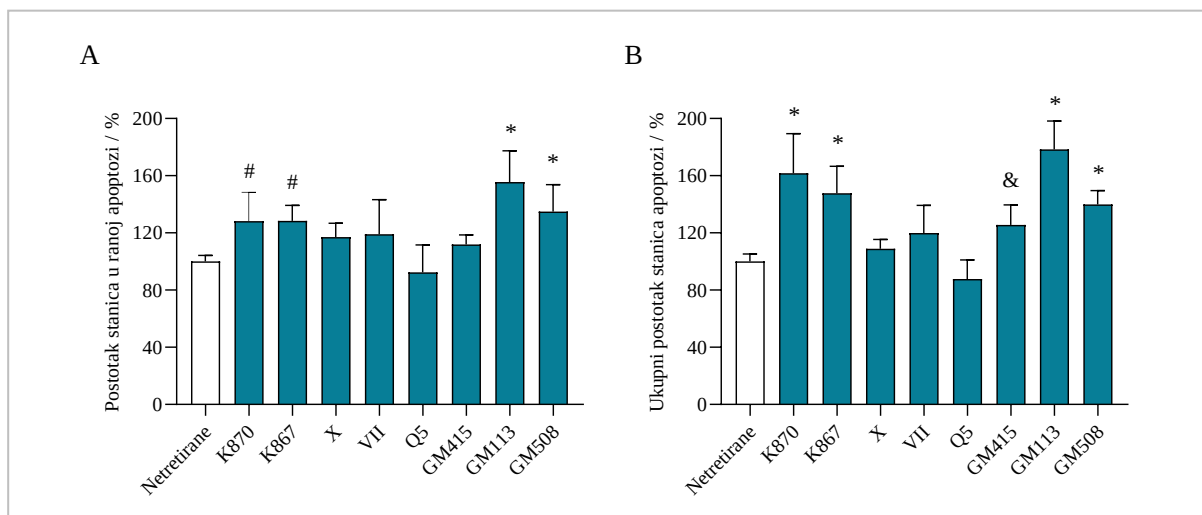


Slika 4.6. Mitohondrijski membranski potencijal nakon 4-satnog tretmana živčanih stanica (SH-SY5Y) odabranim oksimima: **K870** ($15 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** ($400 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** ($200 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** ($250 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** ($100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** ($350 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** ($300 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i **CCCP** ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$). CCCP je korišten kao pozitivna kontrola. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: \$ $p < 0,001$; * $p < 0,0001$.

4.5. Aktivacija programirane stanične smrti

4.5.1. Aktivacija procesa apoptoze

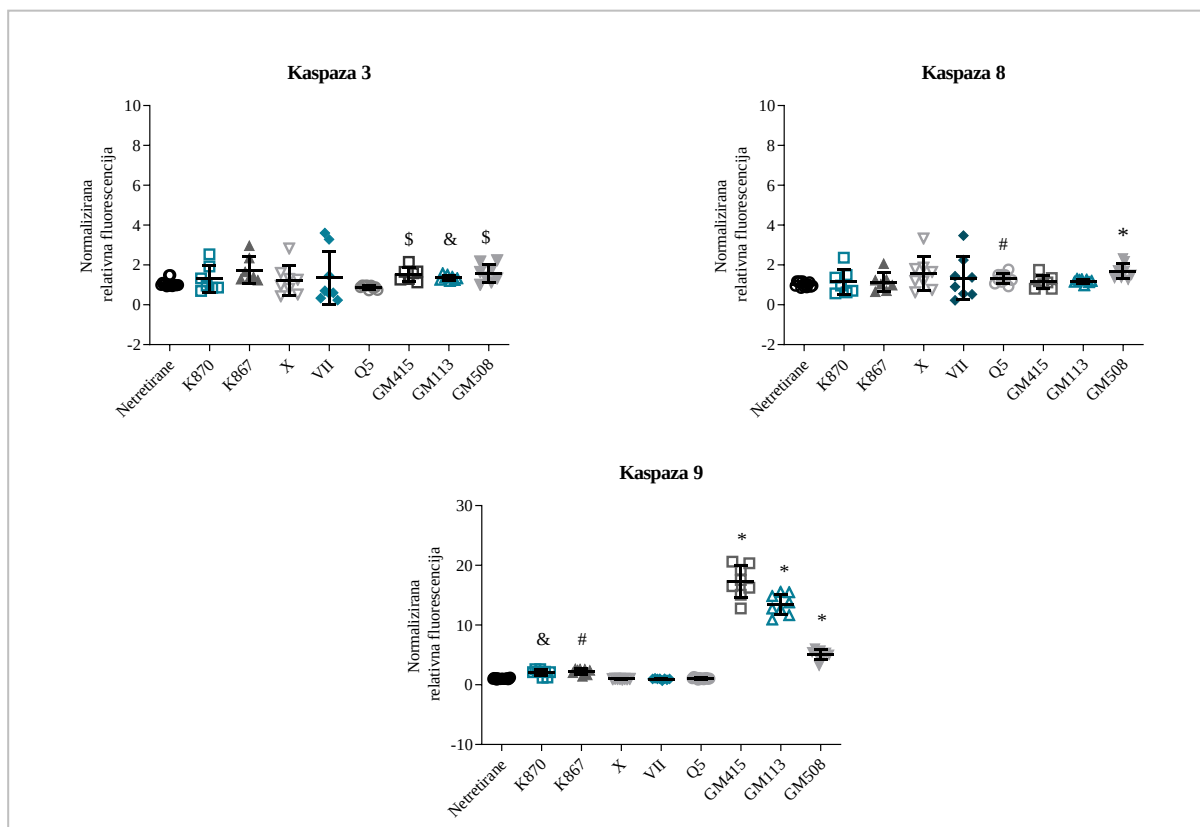
Aktivacija procesa stanične smrti apoptoze i njezinih pojedinih faza određena je na SH-SY5Y stanicama. Na **slici 4.7** prikazani su rezultati dobiveni nakon provedbe testa kao postotak stanica u ranoj apoptozi i ukupnih apoptotičnih stanica (zbroj stanica u ranoj i kasnoj apoptozi) u odnosu na ukupan broj netretiranih stanica u mjerenju. Rezultati testa upućuju kako bispiridniji (K867 i K870) i 3-hidroksi-2-piridinski oksimi (GM415, GM113 i GM508) statistički značajno povećavaju broj stanica u apoptozi.



Slika 4.7. Postotak SH-SY5Y stanica u ranoj apoptozi (A) i ukupne apoptotične stanice (B) (u odnosu na netretirane stanice) nakon 4-satnog tretmana odabranim oksimima: **K870** ($15 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** ($400 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** ($200 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** ($250 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** ($100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** ($350 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** ($300 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Paraformaldehid (0,08%) je korišten kao pozitivna kontrola s vrijednostima 290 % i 298 % za postotak stanica u ranoj apoptozi odnosno za ukupni postotak apoptotičnih stanica. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: &p < 0,05; #p < 0,001; *p < 0,0001.

4.5.2. Aktivacija kaspaza odnosno cistein aspartat-specifičnih proteaza

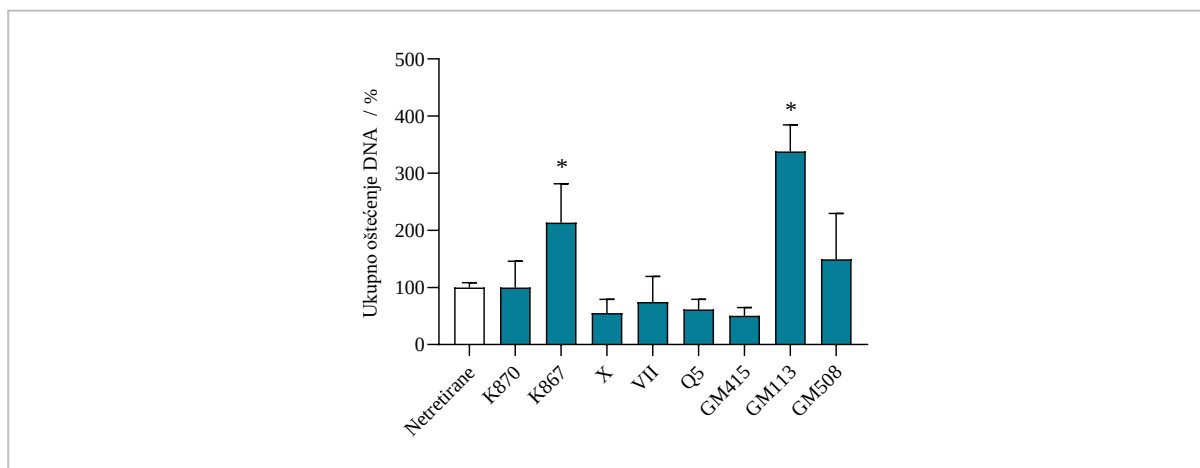
U proces apoptoze uključeni su specifični enzimi kaspaze (cistein-aspartat-ovisne c proteaze) koje imaju ili inicijatorsku ulogu ili egzekutorsku/izvršnu ulogu u procesu apoptoze. Stoga praćenjem aktivacije specifičnih kaspaza može se potvrditi aktivacija procesa regulirane stanične smrti, apoptoze. Dobiveni rezultati prikazani su na **slici 4.8**. Prema dobivenim rezultatima može se vidjeti da bispiridinijevi oksimi K867 i K870 te 3-hidroksi-2-piridinski oksimi aktiviraju inicijatorsku kaspazu 9 i uzrokuju smrt stanice unutarnjim/mitohondrijskim apoptotičkim putom. Uz to, 3-hidroksi-2-piridinski oksim GM508 aktivira i kaspazu 8 koja sudjeluje u vanjskoj/receptorom-posredovanoj apoptozi. Ovu kaspazu aktivirao je i kinuklidinijev oksim Q5. Također, 3-hidroksi-2-piridinski oksimi aktivirali su i izvršnu kaspazu-3 (**slika 4.8**).



Slika 4.8. Aktivnost specifičnih kaspaza nakon 4-satnog tretmana SH-SY5Y stanica odabranim oksimima: **K870** ($15 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** ($400 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** ($200 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** ($250 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** ($100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** ($350 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** ($300 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: & $p < 0,05$; # $p < 0,001$; \$ $p < 0,005$; * $p < 0,0001$.

4.6. Oštećenja molekule DNA uzrokovana oksimima

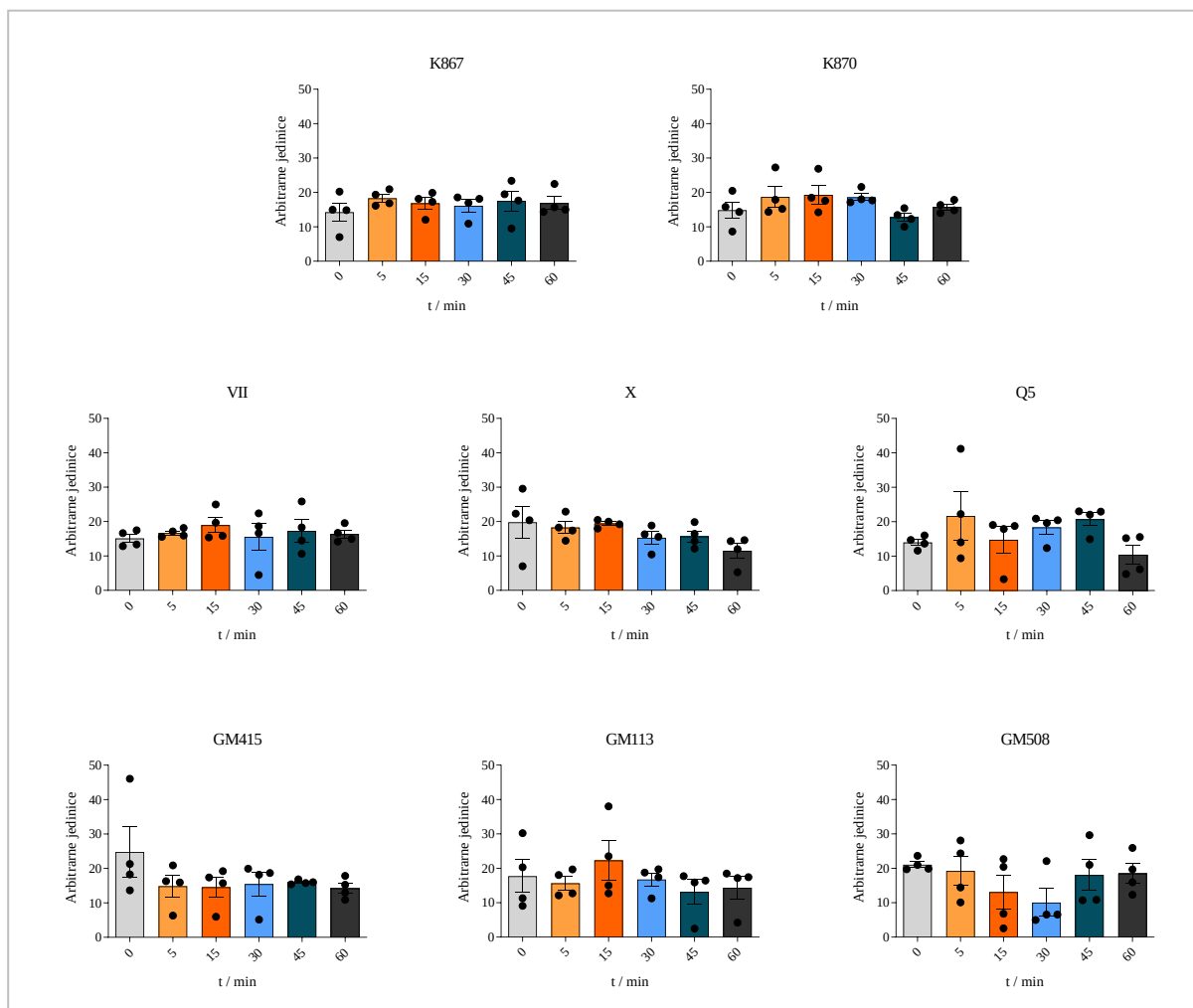
Stanični odgovor na oštećenje DNA ovisno o opsegu i vrsti oštećenja sastoji se od koordiniranih signalnih putova koji mogu inicirati zaustavljanje staničnog ciklusa i popravak ili inicirati apoptozu. Mjerenjem razine aktivacije (fosforilacije) kinaze ATM i histona H2A.X dobiveni su rezultati oštećenja molekule DNA u SH-SY5Y stanicama nakon izloženosti oksimima kao postotak ukupnog oštećenja molekule DNA u odnosu na kontrolne netretirane stanice (**slika 4.9**). Statistički značajno oštećenje molekule DNA primijećeno je kod tretmana oksimima K867 i GM113. Porast oštećenja primijećen je i kod oksima GM508, no nije bio statistički značajan.



Slika 4.9. Aktivacija oštećenja DNA nakon 4-satnog tretmana SH-SY5Y stanica odabranim oksimima (% u odnosu na netretirane stanice): **K870** ($15 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** ($400 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** ($200 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** ($250 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** ($100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** ($350 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** ($300 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Etopozid ($20 \mu\text{mol dm}^{-3}$) je korišten kao pozitivna kontrola s vrijednosti ukupno oštećenih molekula DNA od 824 % u odnosu na netretirane kontrolne stanice. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: * $p < 0,0001$.

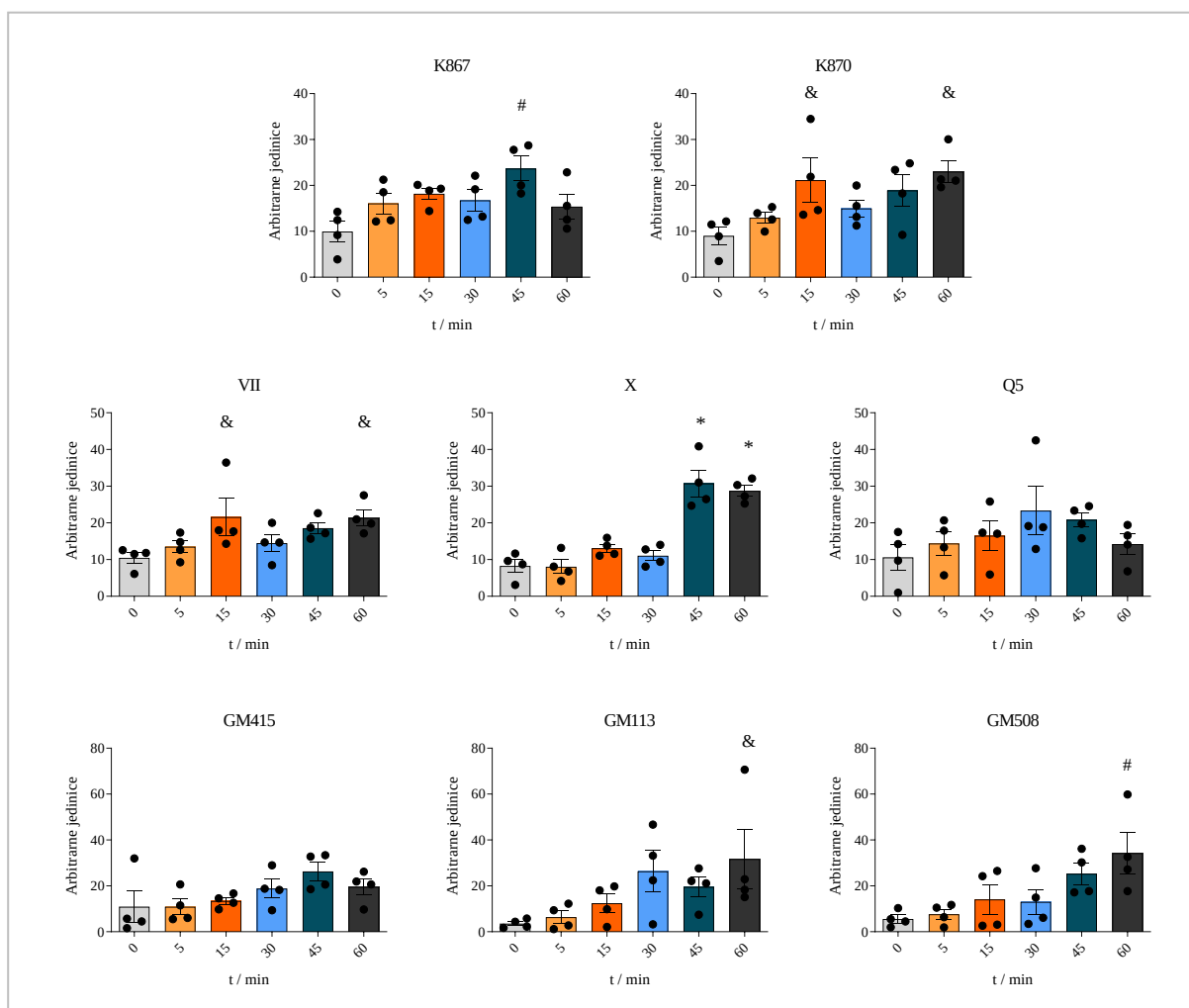
4.7. Fosforilacija specifičnih proteina određenih signalnih putova u stanici

Učinak oksima na signalne putove u SH-SY5Y stanicama određen je nakon 5 – 60 min izloženosti oksimima. Praćena je aktivacija nekoliko meta uključenih u najvažne stanične procese. Dobiveni rezultati ukazuju kako fosforilacija NF- κ B, proteinskog kompleksa koji kontrolira transkripciju DNA, proizvodnju citokina i preživljavanje stanica, nije bila povećana niti u jednom slučaju izloženosti odabranim oksimima (**slika 4.10**).



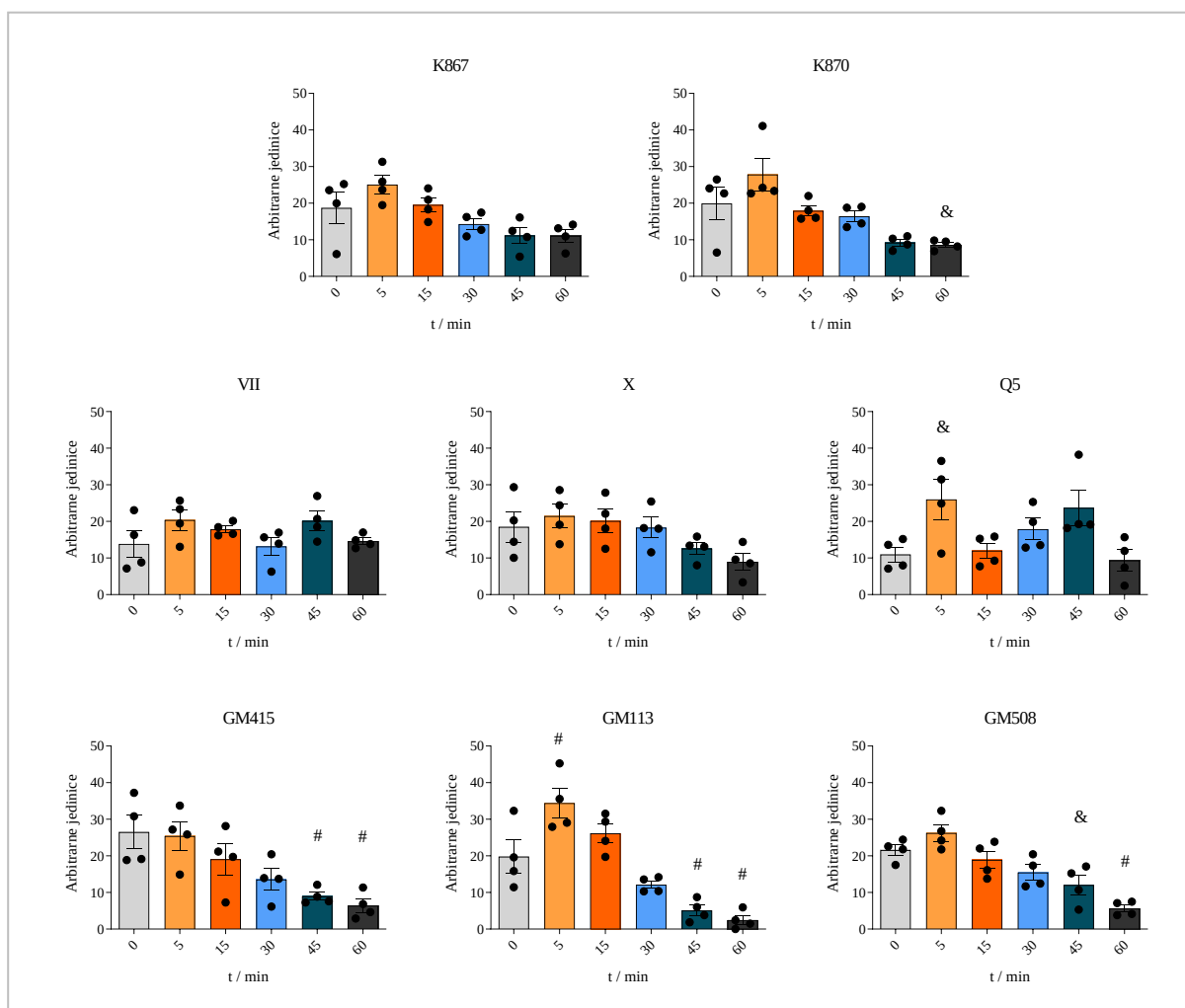
Slika 4.10. Fosforilacija NF-κB nakon 5 – 60 min tretmana SH-SY5Y stanica odabranim oksimima: **K870** (15 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** (400 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** (200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** (250 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** (100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** (350 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** (300 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** (50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje četiri pokusa.

Suprotno tome, izloženost većini oksima (osim Q5 i GM415) značajno je povećala u nekim vremenskim točkama fosforilaciju kinaze p38 MAPK (**slika 4.11**), koja reagira na podražaje stresa poput citokina, zračenja, toplinskog i osmotskog šoka, a uključena je u staničnu diferencijaciju, apoptozu i autofagiju.



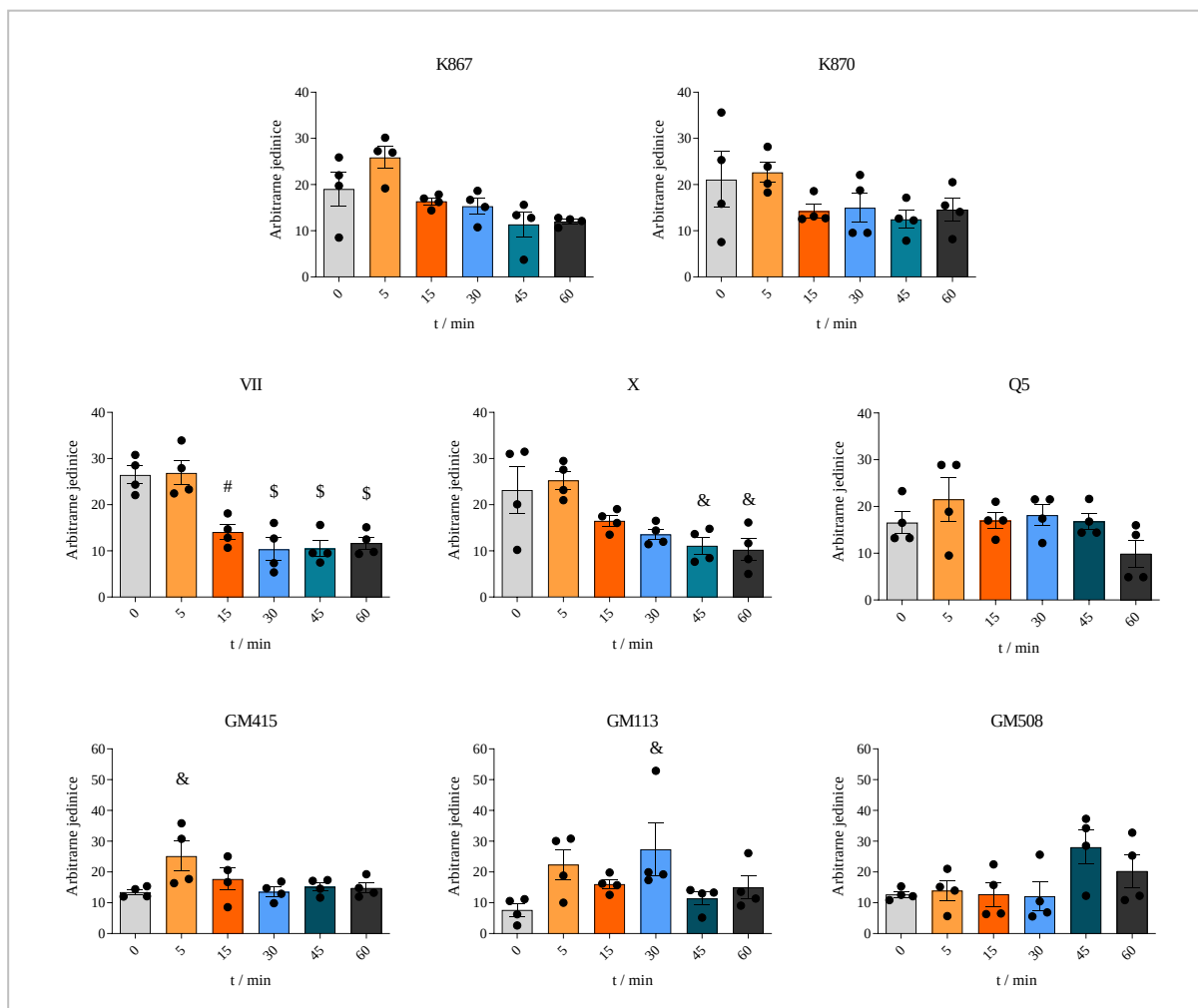
Slika 4.11. Fosforilacija p38 MAPK nakon 5 – 60 min tretmana SH-SY5Y stanica odabranim oksimima: **K870** ($15 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** ($400 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** ($200 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** ($250 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** ($100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** ($350 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** ($300 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje četiri pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: &p < 0,05; #p < 0,001; *p < 0,0001.

Praćena je i fosforilacija STAT3, jednog od važnih transkripcijskih faktora, kojeg aktiviraju citokini (**slika 4.12**). Nakon izloženosti oksimima Q5 i GM113 5 min, fosforilacija STAT3 bila je povećana, dok je izloženost oksimima K870, GM415, GM113 i GM508 smanjila fosforilaciju STAT3 u ovisnosti o vremenu. Statistički značajno smanjenje zabilježeno je nakon izloženosti 45 i 60 min.



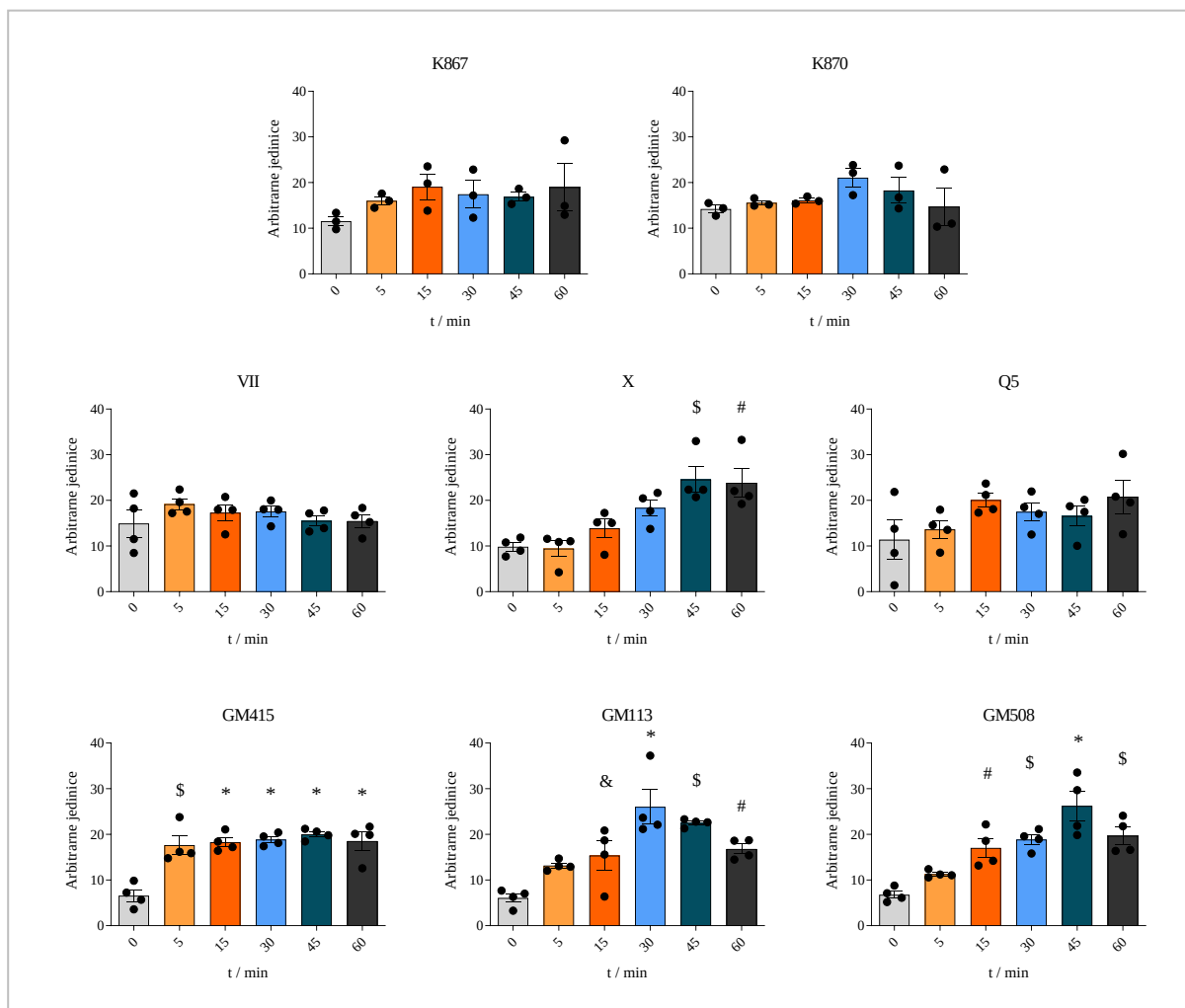
Slika 4.12. Fosforilacija STAT3 nakon 5 – 60 min tretmana SH-SY5Y stanica odabranim oksimima: **K870** (15 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** (400 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** (200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** (250 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** (100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** (350 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** (300 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** (50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje četiri pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: &p < 0,05; #p < 0,001.

Praćenjem fosforilacije izvanstanično regulirane kinaze ERK1/2, uključene u regulaciju mejoze, mitoze i postmitotičke funkcije, zapažena je smanjena fosforilacija nakon izloženosti imidazolijevim oksimima, VII u vremenu od 15 – 60 min i X u vremenu od 45 – 60 min. Nasuprot tome, fosforilacija ERK1/2 bila je povećana nakon izloženosti oksimu GM415 u 5 min, te GM113 u 30 min (**slika 4.13**).



Slika 4.13. Fosforilacija ERK1/2 nakon 5 – 60 min tretmana SH-SY5Y stanica odabranim oksimima: **K870** (15 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** (400 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** (200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** (250 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** (100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** (350 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** (300 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** (50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje četiri pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: &p < 0,05; #p < 0,001; \$p < 0,005.

Zbog učinka 3-hidroksi-2-piridinskih oksima, GM415, GM113 i GM508 na membranski mitohondrijski potencijal (**slika 4.6**), praćena je i fosforilacija acetil-CoA karboksilaze (ACC), koja je jedan od ključnih regulatora oksidacije masnih kiselina u mitohondriju (**slika 4.14**). Tretman GM415, GM113 i GM508 povećao je fosforilaciju ACC već nakon 5 odnosno 15 min, što je i u skladu s njihovim učincima na mitohondrijski membranski potencijal (**slika 4.6**). Kod ostalih ispitivanih oksima, statistički značajno povećanje fosforilacije ACC zamjećeno je jedino kod imidazolijevog oksima X nakon 45 min izloženosti stanica.



Slika 4.14. Fosforilacija ACC nakon 5 – 60 min tretmana SH-SY5Y stanica odabranim oksimima: **K870** (15 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **K867** (400 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **X** (200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **VII** (250 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **Q5** (100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM415** (350 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM113** (300 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), **GM508** (50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška). Parametri su evaluirani iz najmanje četiri pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: &p < 0,05; #p < 0,001; \$p < 0,005; *p < 0,0001.

4.8. Pasivni prolazak oksima kroz staničnu membranu praćen na modelu MDCKII-MDR1 stanica

Mogućnost pasivnog prolaska nekoliko odabranih oksima praćena je na MDCKII-MDR1 stanicama odnosno odredilo se vezanje oksima kao supstrata efluks P-glikoproteinskih pumpi (P-gp) prisutnih na membranama stanica i njihova translokacija kroz istu. Dobiveni rezultati prikazani u **tablici 4.8** ukazuju kako testirani oksimi pripadaju kategoriji spojeva niske ili umjerene mogućnosti pasivnog prolaska kroz membrane. Dobivene vrijednosti upućuju da su oksimi također P-gp supstrati, odnosno da će po prolasku membrane biti izbačeni van ukoliko su prisutni ovi transportni proteini.

Tablica 4.8. Pasivni prolazak *in vitro* odabranih oksima i procjena kao potencijalnih supstrata za P-gp pumpe na MDCK stanicama. Prolazak oksima je praćen s apikalne do bazolateralne (A2B), kao s bazolateralne do apikalne strane (B2A). Vrijednosti permeabilnosti membrane (P_{app}) u oba smjera određene su uz i bez prisutnosti specifičnog inhibitora P-gp pumpi (Elikridara).

Oksim	Prisutnost inhibitora	P_{app} (A2B)	Ravnoteža mase (A2B)	P_{app} (B2A)	Ravnoteža mase (B2A)	Efluks (omjer) ili P_e^a	Mogućnost pasivnog prolaska kroz membrane	P-gp supstrat
K867 ^a	-	n ^b	n ^b	n ^b	n ^b	2.60 ± 0.22 ^a	Niska	n ^b
	-	n ^b	n ^b	n ^b	n ^b			
K870 ^a	-	n ^b	n ^b	n ^b	n ^b	2.21 ± 0.32 ^a	Niska	n ^b
	-	n ^b	n ^b	n ^b	n ^b			
VII	-	0,3	66	3,6	70	11,8	Niska	Da
	+	1,9	76	2,3	76	1,2		
X	-	0,3	65	3,5	72	20,7	Niska	Da
	+	0,7	76	1,7	70	2,6		
Q5	-	0,1	60	12,0	69	178,4	Niska	Da
	+	0,3	60	2,1	74	7,4		
GM415	-	4,6	90	40,9	92	9,5	Umjerena	Da
	+	21,3	88	25,3	97	1,2		
GM113	-	0,4	54	10,5	65	21,2	Umjerena	Da
	+	4,8	50	7,0	75	1,7		
GM508	-	0,8	63	16,1	74	23,2	Niska	Da
	+	3,9	50	3,6	84	0,9		

^a vrijednosti penetrabilnosti ($P_e \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) oksima određene metodom permeabilnosti umjetne membrane (engl. *parallel artificial membrane permeation assay*, PAMPA)²⁴; ^b n – vrijednosti koje nisu određene

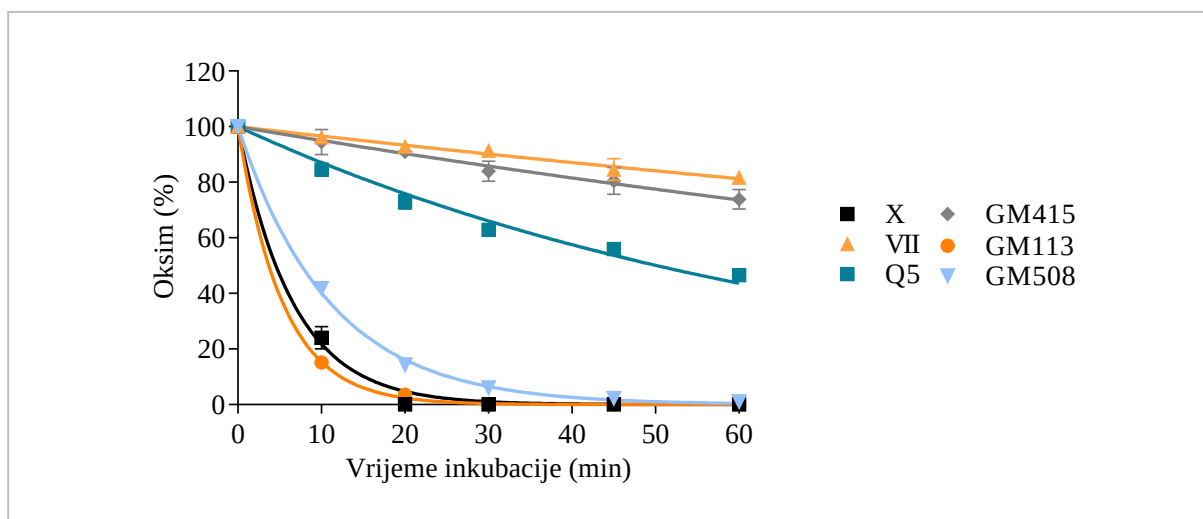
4.9. Metabolička stabilnost odabranih oksima

Stabilnost oksima u biološkom sustavu je bitan faktor za njihovu primjenu kao potencijalnih lijekova, odnosno, protuotrova inhibiranih kolinesteraza. Kako bismo procijenili metaboliziraju li se odabrani oksimi u biološkom sustavu, testirana je njihova metabolička stabilnost u mikrosomima (**tablica 4.9**). Pri odabranim uvjetima, stabilnost bispiridinijevih oksima nije se mogla odrediti. Oksimi Q5, X, GM113 i GM508 pokazali su nisku metaboličku stabilnost, jer se već nakon 30 minuta neki od njih potpuno metaboliziraju (**slika 4.15**). Zamjenom metilne skupine (VII), klorom (X) unutar strukture imidazolijevih oksima, dolazi do smanjenja metaboličke stabilnosti. Smanjenje stabilnosti je primijećeno i dodatkom fenilne (GM113) ili dimetilamino-skupine (GM508) na hidroizokinolinski ogranak kod 3-hidroksi-2-piridinskih oksima (**slika 4.15**).

Tablica 4.9. Metabolička stabilnost odabranih oksima uslijed inkubacije s mikrosomima: poluvrijeme razgradnje spoja ($t_{1/2}$), vrijednosti unutarnjeg klirensa (Cl_{int}) i *in vivo* hepatičkog klirensa (LBF , *engl.* liver blood flow) izračunate jednadžbama (4) i (5) te kategorija metaboličke stabilnosti kojoj pripadaju.

Oksim	$t_{1/2}$ (min)	Cl_{int} ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Preostali % nakon 60min	LBF / %	Kategorija metaboličke stabilnosti
K867	n ^a	n ^a	n ^a	n ^a	n ^a
K870	n ^a	n ^a	n ^a	n ^a	n ^a
VII	200	6,92	81,7	55	Umjerena
X	4,55	306	0,00	98	Niska
Q5	50,2	27,6	46,6	88	Niska
GM415	139	10,2	75,0	39	Umjerena
GM113	3,71	374	0,00	99	Niska
GM508	7,6	182,2	0,00	92	Niska

^a n – vrijednost metaboličke stabilnosti za bispiridinijeve oksime nije se mogla odrediti primijenjenom metode za detekciju spojeva u uzorku.



Slika 4.15. Metabolička stabilnost odabranih oksima uslijed inkubacije s mikrosomima izražena kao ovisnost pada koncentracije prisutnog oksima o vremenu inkubacije. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ($\pm$ standardna pogreška) iz najmanje tri pokusa.

4.10. *In silico* računalna analiza svojstava i djelovanja oksima

4.10.1. Fizikalno kemijska svojstva

Provedena je *in silico* analiza fizikalno – kemijskih svojstava oksima važnih za procjenu pasivnog prolaska kroz membrane. Ove analize za koje je korišteno sučelje *Chemicalize*, uzimaju u obzir parametre poput relativne molekulske mase (M_r), broja donora i akceptora vodikovih veza (engl. *hydrogen bond donor or acceptor*, HBD i HBA), broja rotirajućih veza (engl. *rotatable bonds*, RB), te polarnu površinu spoja (engl. *topological polar surface area*, TPSA). Prema dobivenim podacima prikazanim u **tablici 4.10**, prolazak kroz biološke membrane predviđen je kod svih oksima osim za GM508 čiji parametri izlaze iz svih danih okvira preporuka. Uz to, negativne logP vrijednosti (logaritam koeficijenta raspodjele između vode i organskog otapala) mogle bi bispiridinijevim oksima K867 i K870 otežati pasivni prolazak u stanicu.

Tablica 4.10. *In silico* procijenjena fizikalno – kemijska svojstva oksima pomoću sučelja *Chemicalize*: molarna masa (M_r), područje ukupne polarne površine (TPSA), broj donora (HBD) i akceptora (HBA) vodikovih veza, te broj veza koje se rotiraju (RB).

Oksim	M_r / g mol ⁻¹	TPSA / Å ²	HBD	HBA	RB	logP	log D
K867	332,80	83,44	2	3	6	-6,84	-7,44
K870	367,24	83,44	2	3	6	-6,24	-7,30
VII	361,25	41,40	1	2	5	1,09	1,06
X	340,83	41,40	1	2	5	1,00	0,99
Q5	309,29	32,59	1	2	11	1,02	1,05
GM415	399,49	87,41	2	7	9	3,09	2,78
GM113	475,59	87,41	2	7	10	4,67	4,36
GM508	518,66	90,65	2	8	11	4,77	4,46
Preporučene vrijednosti ¹⁶⁵	< 450	< 60 – 70	< 3	< 7	< 8	< 5	< 5

4.10.2. Utjecaj na enzime sustava citokrom P450

In silico analizom (korištenjem programa *SwissADME*) provjereno je inhibiraju li odabrani oksimi ključne enzime sustava citokrom P450 (CYP) koji su odgovorni za metabolizam većine ksenobiotika/lijekova u biološkom sustavu. Iz **tablice 4.11** vidljivo je da prema računalnoj procjeni bispiridinijevi oksimi K867 i K870 ne inhibiraju testirane CYP-ove. Zanimljivo je primijetiti da svi ostali testirani oksimi inhibiraju CYP2D6, koji je dogovoran za dodatak ili uklanjanje pojedinih funkcionalnih grupa ksenobiotika hidroksilacijom, demetilacijom i

dealkilacijom¹⁶⁸. Imidazolijev oksim VII, za razliku od oksima X, uz CYP2D6 inhibira i CYP2C19, zadužen za hidroksilaciju i stvaranje epoksida (kratkoživućih signalnih molekula)¹⁶⁹. 3-hidroksi-2-piridinska skupina oksima, uz CYP2D6 inhibira i CYP3A4, odgovoran za oksidacijske procese čime deaktivira ili bioaktivira ksenobiotike. Iz te skupine se može izdvojiti GM508, koji dodatno inhibira CYP2C19, kao i oksim VII.

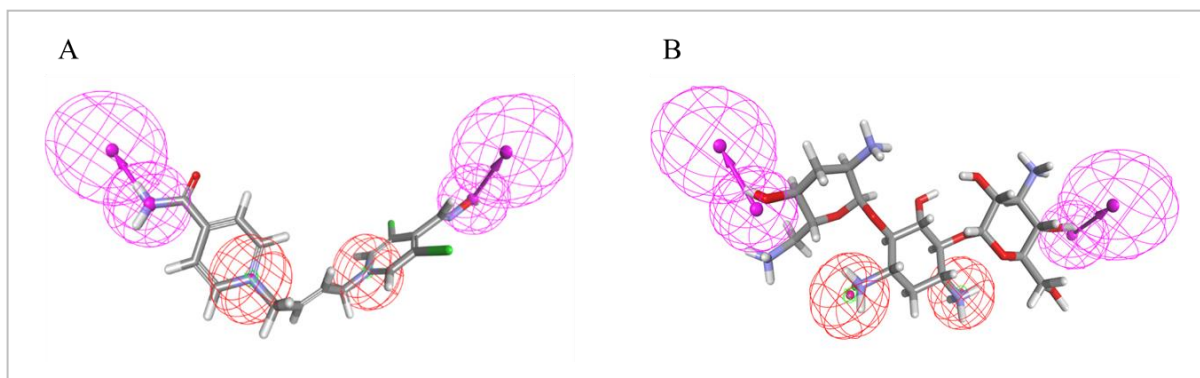
Tablica 4.11. *In silico* procijena odabranih oksima kao inhibitora specifičnih enzima citokrom P450 enzimskog sustava.

Oksim	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
K867	-	-	-	-	-
K870	-	-	-	-	-
VII	-	+	-	+	-
X	-	-	-	+	-
Q5	-	-	-	+	-
GM415	-	-	-	+	+
GM113	-	-	-	+	+
GM508	-	+	-	+	+

(-) spoj ne inhibira navedene CYP-ove; (+) spoj inhibira navedene CYP-ove

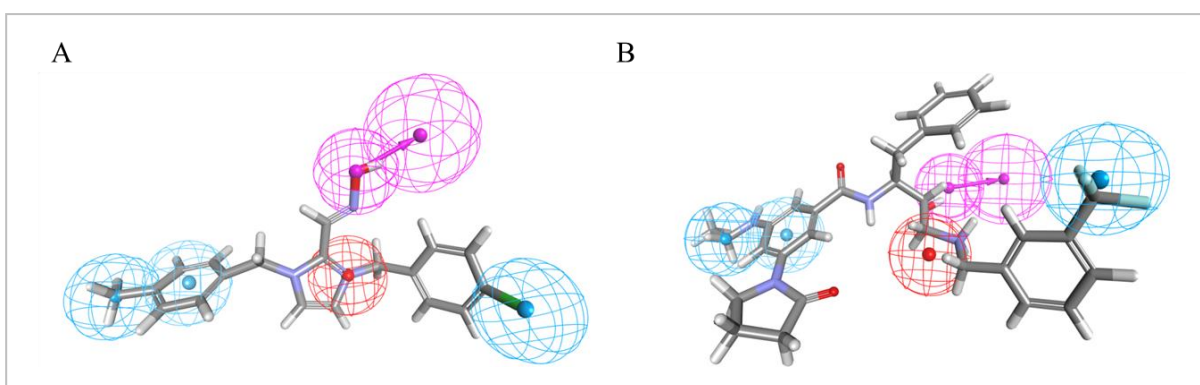
4.10.3. Usporedba oksima s ligandima poznatog djelovanja iz dostupnih baza pomoću farmakofornog modela

U svrhu identifikacije specifičnih staničnih meta koje interferiraju s odabranim bispiridinijevim, kinuklidinijevim, imidazolijevim i 3-hidroksi-2-piridinskim oksimima, generirani su farmakoforni modeli na osnovu svih testiranih oksima pojedine serije. Farmakoforni model bispiridinijevih oksima temeljen je na strukturama 12 bispiridinijevih oksima (prikazano u **tablici 3.1.**) zajedno s pridruženim IC₅₀ vrijednostima^{24,151}. Odabrani farmakoforni model poravnat s najaktivnijim bispiridinijevim oksimom K870 prikazan je na **slici 4.16**. Najbolje ocijenjeni ligandi koji su najbolje poravnati s farmakofornim modelom izdvojeni su u slučaju postojanja poznate stanične mete. U slučaju farmakofornog modela generiranog na temelju bispiridinijevih oksima, identificiran je tobramicin (**slika 4.16**), aminoglikozidni antibiotik izveden iz *Streptomyces tenebrarius*, čiji se mehanizam djelovanja temelji na ireverzibilnom vezanju na specifični aminoglikozidni receptor na 30S ribosomskoj podjedinici i posljedičnom blokiranju nastajanja kompleksa između 30S podjedinice i glasničke RNA¹⁷⁰.



Slika 4.16. A) Bispiridinijev oksim K870 i B) tobramicin mapirani na farmakoforni model za bispiridinijeve oksime. Crveno označava pozitivan naboj, a magenta donora vodikovih veza.

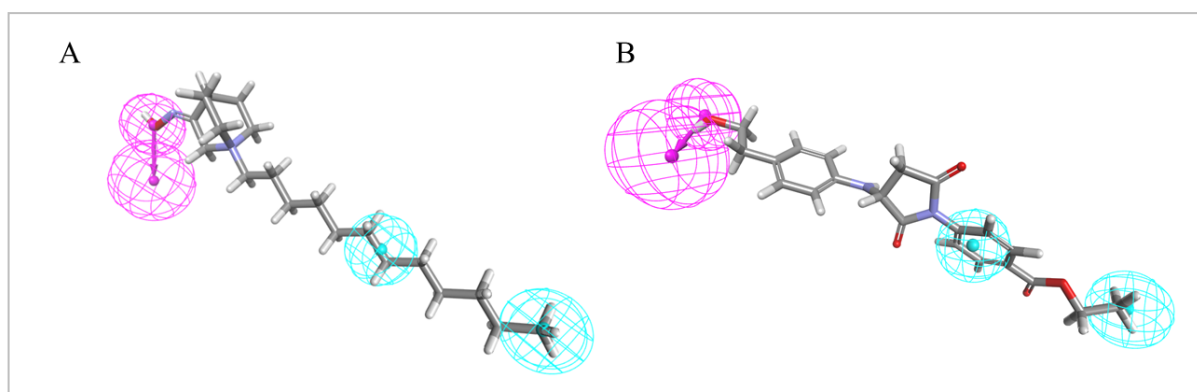
U slučaju imidazolijevih oksima (prikazani u **tablici 3.2**) prilikom generiranja farmakofornog modela korištene su i dodatne strukture s IC_{50} vrijednostima određenima u prijašnjem istraživanju na HepG2 staničnoj liniji²⁵. Na temelju odabranih konačnih farmakornih modela identificiran je ligand i njegova stanična meta: 3-(etilamino)-*N*-[(2*S*,3*R*)-3-hidroksi-1-fenil-4-[[3-(trifluorometil)fenil] metilamino]butan-2-il]-5-(2-oksopirrolidin-1-il)benzamid i beta-sekretaza 1 (BACE1) – aspartatska proteaza (**slika 4.17**), uključena u nastajanje mijelinskih ovojnica u perifernim živčanim stanicama i s važnom ulogom u nastajanju amiloid- β -peptida u slučaju Alzheimerove bolesti¹⁷¹.



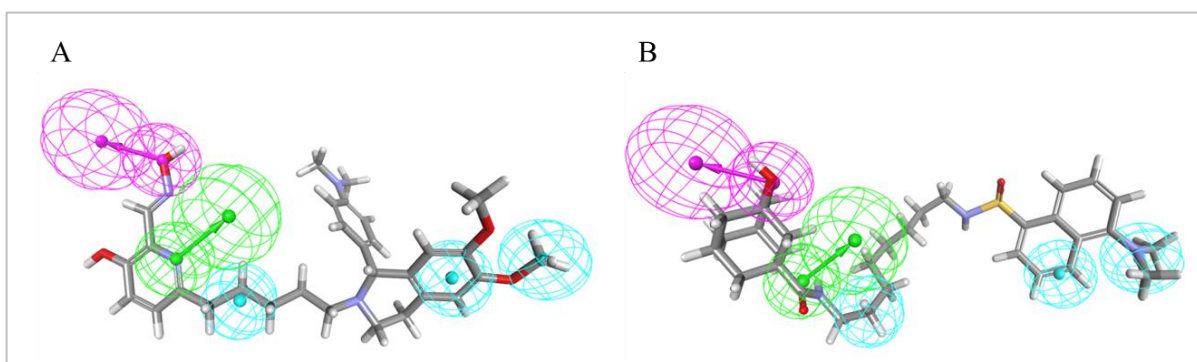
Slika 4.17. A) Imidazolijev oksim X i B) 3-(etilamino)-*N*-[(2*S*,3*R*)-3-hidroksi-1-fenil-4-[[3-(trifluorometil)fenil]metilamino]butan-2-il]-5-(2-oksopirrolidin-1-il)benzamid mapirani na farmakoforni model za imidazolijeve oksime. Crveno označava pozitivno ionizabilnu skupinu, magenta donora vodikovih veza, a plavo aromatsku, odnosno alifatsku hidrofobnu skupinu.

Za generiranje farmakofornih modela na temelju kinuklidinijevih (prikazani u **tablici 3.3**), odnosno 3-hidroksi-2-piridinskih (prikazani u **tablica 3.4**) oksima korištene su također IC_{50} vrijednosti određene na HepG2 staničnoj liniji. Pretraživanjem baza spojeva i njihovim mapiranjem na osnovu dobivenog farmakofornog modela identificirani su ligandi i njima pridružene stanične mete: u slučaju farmakofornog modela određenog za kinuklidinijeve

oksime identificiran je inhibitor aldehid dehidrogenaze A1 – Etil 4-(3-{[4-(2-hidroksietil)fenil]amino}-2,5-diokso-1-pirolidinil)benzoat (**slika 4.18**); u slučaju farmakoformnog modela za 3-hidroksi-2-piridinske oksime identificiran je inhibitor citokrom P450cam – (1*R*,3*S*,5*R*,7*S*)-*N*-[8-([5-(dimetilamino)naftalen-1-il]sulfonil)amino]oktil]-3 hidroksitriciklo[3.3.1.1[~]3,7[~]]dekan-1-karboksamid (**slika 4.19**).



Slika 4.18. A) Kinuklidinijev oksim Q5 i B) Etil 4-(3-{[4-(2-hidroksietil)fenil]amino}-2,5-diokso-1-pirolidinil)benzoat mapirani na farmakoformni model za kinuklidinijeve oksime. Magenta označava donora vodikovih veza, a plavo hidrofbnu skupinu.



Slika 4.19. A) 3-hidroksi-2-piridinijski oksim GM508 i B) (1*R*,3*S*,5*R*,7*S*)-*N*-[8-([5-(dimetilamino)naftalen-1-il]sulfonil)amino]oktil]-3 hidroksitriciklo[3.3.1.1[~]3,7[~]]dekan-1-karboksamid mapirani na farmakoformni model za 3-hidroksi-2-piridinske oksime. Magenta označava donora vodikovih veza, plavo hidrofbnu skupinu, a zeleno akceptora vodikovih veza.

§ 5. RASPRAVA

Cilj ove doktorske disertacije bio je načiniti rani probir oksima temeljen na staničnim testovima i pokazati povezanost učinaka na staničnoj razini sa specifičnim strukturnim elementima oksima, koji nisu nužno uključeni u njihovo primarno djelovanje odnosno reaktivaciju AChE. Ovakav pristup isključio bi oksime nezadovoljavajućih karakteristika iz daljnjih istraživanja već u ranoj fazi razvoja novih protuotrova. U tu svrhu ispitane su četiri serije oksima različitih strukturnih karakteristika, najčešće korištenih u razvoju novih reaktivatora AChE: bispiridinijevi, imidazolijevi, kinuklidinijevi i 3-hidroksi-2-piridinski oksimi.

Za imidazolijeve oksime VII i X te kinuklidinijev Q5, pokazano je da utječu na integritet stanične membrane, oštećuju stanicu i uzrokuju trenutnu smrt stanice, dok je toksičnost bispiridinijevih i 3-hidroksi-2-piridinskih oksima posljedica drugog mehanizma stanične smrti – regulirane stanične smrti, apoptoze¹⁷². Valja istaknuti i kako se citotoksični učinak svih oksima nije razlikovao ovisno o tipu stanica, što pretpostavlja jednak mehanizam staničnog djelovanja.

Iako provedeno detaljno istraživanje nije dalo jednoznačan odgovor što je uzrok, a što posljedica djelovanja oksima, rezultati ipak izdvajaju oksidacijski stres kao jedan od mogućih okidača toksičnosti. Iznimka je uočena jedino kod 3-hidroksi-2-piridinskog oksima GM508 i kinuklidinijevog oksima Q5 što upućuje na činjenicu da razlike u strukturi, poput dodatka dimetilaminofenilnog supstituenta na hidroizokinolinski pobočni ogranak te kinuklidinijeva jezgra s alkilnim lancem, značajno utječu na mehanizam djelovanja na stanice. Nadalje, kod većine oksima, uz iznimku dva prethodno navedena, zamijećena je i aktivacija jednog čimbenika obrane od oksidacijskog stresa odnosno oksidacija unutarstaničnog tiola glutationa (GSH) kao pokazatelja antioksidacijskog statusa¹⁷³, što bi dodatno trebalo ispitati. Također, 3-hidroksi-2-piridinski oksimi, GM415 i GM113, povećali su razinu GSH što može sugerirati početak sinteze novog GSH¹³² kao načina adaptacije na novonastale uvjete (**slika 4.1**). Uz to, povećana indukcija ROS-ova povezana je sa zamijećenim sniženjem ili povećanjem mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$)¹⁷⁴ nakon tretmana oksimima. Takva promjena potencijala uzrokuje disfunkciju mitohondrija i poremećaj lanca oksidacijske fosforilacije¹⁷⁴ što je ujedno i usko povezano s različitim staničnim patologijama¹³². Poremećaj oksidacijske fosforilacije odražava se i na razinu adenozin trifosfata (ATP-a), energetske valute

stanice. Naime, u slučaju da stanica nema dovoljno energije za pokretanje apoptoze, mehanizam će se okrenuti staničnoj smrti putem nekroze^{160,175}, što je vjerojatno bio učinak djelovanja imidazolijevih oksima VII i X. Nasuprot tome, apoptoza je zabilježena nakon tretmana bispiridinijevim i 3-hidroksi-2-piridinskim oksimima, aktivacijom enzima kaspaze 9, odgovorne za pokretanje unutarstaničnog, puta ovisnog o mitohondriju¹⁷⁶. Zanimljivo je za primijetiti da kinuklidinijev oksim Q5 i 3-hidroksi-2-piridinski oksim GM508, kod kojih nije zamijećena indukcija ROS-ova, aktiviraju kaspazu 8, odgovornu za pokretanje apoptoze izvanstaničnim, putom ovisnim o receptoru. Moguće je da mehanizam djelovanja ova dva oksima uključuje vezanje na receptore smrti, posebno na one iz porodice receptora povezanih s faktorima nekroze tumora (TNF)¹⁷⁷. Također, pretpostavlja se da dugi alikilni lanci na kinuklidinijevoj strukturi kao kod Q5 oponašaju masne kiseline i djeluju na promjene u staničnoj membrani¹⁷⁸, potencijalno stvaraju micelle¹⁷⁹ i samim time posljedično dovode do smrti stanice.

Drugi mogući mehanizam djelovanja odabranih spojeva je djelovanje putem interakcije s acetilkolinskim (nikotinskim i muskarinskim) ili drugim receptorima prisutnim na staničnoj membrani čime utječu na signalne putove u stanici. Općenito, fosforilacijom i aktivacijom kinaza poput p38 MAPK, stanica odgovara na stres i prolazi procese diferencijacije, apoptoze ili autofagije. Ujedno, aktivacija p38 MAPK (**slika 4.11**) je povezana s indukcijom oksidacijskog stresa i aktivacijom kaspaza 8 i 9¹⁸⁰, što je primijećeno i u ovom radu nakon izlaganja stanica imidazolijevim, bispiridinijevim i 3-hidroksi-2-piridinskim oksimima. Nadalje, značajno smanjena fosforilacija transkripcijskog faktora STAT3, koja je pokazana kod oksima K870, GM415, GM113 i GM508, utječe na smanjenu transkripciju proteina neophodnih za održavanje homeostaze stanice, a može biti povezana s djelovanjem na receptore citokina i epidermalnih faktora rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF)¹⁸¹. Teoretski, oksimi mogu inhibirati i receptore faktora rasta (engl. *growth factor receptors*, GFR)^{182,183}, što bi dodatno objasnilo npr. aktivaciju apoptoze mitohondrijskim putom, budući da inhibicija GFR ne dovodi do aktivacije anti-apoptotičnih proteina Bcl-2^{184,185}. Nadalje, aktivacijom kinaze ERK1/2 stanica sudjeluje u regulaciji mejoze, mitoze i postmitotičke funkcije¹⁸⁶, za čiju aktivaciju je potreban ATP¹⁸⁷, što se pokazalo točnim u slučaju izloženosti oksimima GM415 i GM113. S druge strane, imidazolijevi oksimi, utječu na smanjuju fosforilaciju ERK1/2 (**slika 4.13**). Kod 3-hidroksi-2-piridinskih oksima i imidazolijevog oksima X, zabilježena je i pojačana

fosforilacija acetil-CoA karboksilaze (ACC). Inače, fosforilacija inhibira aktivnost ACC i uzrokuje povećanu oksidaciju i smanjenu sintezu masnih kiselina¹⁸⁸.

Pretpostavljeni mehanizam djelovanja oksima ovisi i o njihovoj mogućnosti ulaska u stanicu, bilo pasivnim, primarnim aktivnim ili sekundarnim aktivnim prijenosom^{189,190}. Uspiju li oksimi pasivno proći biološke membrane, naići će na prepreku, P-glikoprotein (P-gp) pumpe čija je zadaća izbaciti spojeve natrag kako bi održali homeostazu stanice i uklonili potencijalno toksične spojeve¹⁹¹. Iz literature je već poznato da bispiridinijevi oksimi K867 i K870 pokazuju nisku do umjerenu mogućnost prolaska kroz membrane²⁴. Općenito, za prolazak molekule pasivnim prijenosom bitna su određena fizikalno – kemijska svojstva poput veličine molekule, lipofilnosti, polarnosti te fleksibilnosti. Prema eksperimentalno dobivenim rezultatima, možemo zaključiti kako su neovisno o strukturi, svi testirani oksimi P-gp supstrati, relativno niskog potencijala za pasivni prolazak u stanicu. Međutim, može se primjetiti da dodatak dimetilamino-skupina na hidroizokinolinskom supstituentu kod 3-hidroksi-2-piridinskih oksima značajno smanjuje mogućnost pasivnog prolaska kroz membrane u usporedbi s drugim oksimima iz te skupine, GM415 i GM113. Također, i *in silico* analizom procijenjen je nizak potencijal prolaska oksima, zbog manjkavih karakteristika kao što su prevelika molekulska masa (M_r), područje polarne površine (TPSA), broja veza koje se rotiraju (RB) ili nizak $\log P$ ¹⁶⁵. No, to ne znači da oksimi neće ući u stanicu nekim drugim načinom, npr. aktivnim prijenosom putem nekog od transportera.

Potencijalne mete djelovanja odabranih oksima koje bi bile uzrokom zamijećenih toksičnih učinaka, procijenjene su i *in silico* metodama. Iako u našem istraživanju dobiveni rezultati ne upućuju na konkretne zaključke, dobivena je šira slika mogućih meta oksima kao potencijal za daljnja istraživanja. Prvenstveno, kao potencijalne mete izdvojeni su enzimi sustava citokroma P450 (CYP2D6, CYP3A4) koji su i odgovorni za metabolizam ksenobiotika/lijekova. Za ovdje testirane oksime, koji su svrstani u skupinu umjerene ili niske metaboličke stabilnosti, ovakav rezultat može imati značaj kod eventualne primjene *in vivo* kada bi npr. inhibicijom ovih enzima direktno smanjili mogućnost metaboliziranja spojeva i povećali njihovu toksičnost. Uz to, potencijalna farmakološka meta 3-hidroksi-2-piridinskih oksima, predviđena molekulskim modeliranjem farmakofora, je i CYP101 iz bakterije *Pseudomonas putida*¹⁹², što sugerira mogućnost inhibicije i ostalih citokroma P450 zbog sličnosti struktura¹⁹³. Nasuprot tome, pretpostavljena farmakološka meta kinuklidinijevog oksim Q5 je aldehid dehidrogenaza A1 (ALDH1A1), detoksifikacijski enzim lokaliziran primarno u jetri nužan za

zaštitu organizma od štetnih spojeva¹⁹⁴. Tako je, 1,5 – 8 puta niža IC₅₀ vrijednost zabilježena na jetrenim stanicama HepG2 koje eksprimiraju ALDH1¹⁹⁵, nakon tretmana oksimom Q5, u usporedbi s ostalim tipovima stanica. Uz to, mogućnost inhibicije ALDH1 može se usmjeriti u istraživanja specifičnih inhibitora koji se koriste za blokiranje napretka proliferacije stanica raka jajnika¹⁹⁶. U slučaju farmakofornog modela generiranog na temelju bispiridinijevih oksima identificiran je tobramicin, aminoglikozidni antibiotik izveden iz *Streptomyces tenebrarius*, korišten prvenstveno za tretiranje gram-negativnih bakterijskih infekcija¹⁹⁷ čiji se mehanizam djelovanja temelji na ireverzibilnom vezanju na specifični aminoglikozidni receptor na 30S ribosomskoj podjedinici i posljedičnom blokiranju nastajanja kompleksa između 30S podjedinice i glasničke RNA¹⁷⁰. Zbog toga, bispiridinijevi oksimi K867 i K870 bi se mogli potencijalno uključiti u istraživanja razvoja novih antibiotika i antibakterijskih agenasa. Potencijalna farmakološka meta djelovanja imidazolijskih oksima, VII i X, prema farmakofornom modelu je beta-sekretaza 1 (BACE1). Zanimljivo je da ta aspartatska proteaza uključena u nastajanje mijelinskih ovojnica u perifernim živčanim stanicama i s važnom ulogom u nastajanju amiloid- β -peptida u slučaju Alzheimerove bolesti¹⁷¹, što predstavlja novi smjer za istraživanje djelovanja ovih oksima.

Naravno, treba imati u vidu potencijalno drugačiji odgovor pri testiranju oksima u *in vivo* sustavu zbog međudjelovanja svih komponentni biološkog sustava i procesa poput apsorpcije, distribucije i eliminacije spoja iz organizma¹³². Nadalje, za istraživanja je indikativno definirati i međusobne interakcije spojeva koje doprinose utjecaju na biološki sustav kako bi se izbjegle nenamjerne posljedice na ljude ili pronašla poželjna rješenja za bolesti ili različite medicinske terapije upotrebom kombinacije spojeva¹³². Tako, dva spoja u kombinaciji mogu imati nekoliko mehanizama djelovanja: aditivni, antagonistički, potencijski ili sinergistički učinak u usporedbi s njihovim individualnim djelovanjem. U slučaju testiranih oksima, npr. kombinacija imidazolijskih oksima VII i X, te 3-hidroksi-2-piridinskih GM415 i GM508 rezultirala je pojavom sinergističkog toksičnog učinka. Isto tako, kombinacija oksima Q5 s K867, VII, X, GM415 i GM113; VII s 3-hidroksi-2-piridinskim oksimima te X s GM415 i GM113 rezultirala je potencijskim toksičnim učinkom. Naime, sinergistički i potencijski učinak je isti tip djelovanja, no razlikuju po tome jesu li u kombinaciji analogne strukture ili ne¹³². Dakle, prilikom eventualne primjene *in vitro* ili *in vivo* istraživanjima, nikako ne bi trebalo koristiti navedene oksime u kombinaciji.

Uzimajući u obzir sve ovdje prikazane rezultate istraživanja na stanicama i *in silico* analize, ali i rezultate prethodnih istraživanja djelovanja oksima na primarnu metu u organizmu tj. enzime AChE i BChE, mogu se istaknuti općenite preporuke prikazane u **tablici 5.1**:

Tablica 5.1. Kvalitativni prikaz djelovanja odabranih oksima na primarne mete i stanice.

Oksimi	Inhibicija AChE	Inhibicija BChE	Reaktivacija AChE	Reaktivacija BChE	Citotoksičnost
Bispiridinijevi					
K203	+	-	+	-	-
K048	+	-	+	-	-
K867	+	-	+	-	+
K868	+	-	+	-	-
K869	+	-	+	-	-
K870	+	-	+	-	+
Imidazolijski					
IV	-	+	-	+	-
VI	-	+	-	+	-
VII	-	+	-	+	+
X	-	+	-	+	+
Kinuklidinijski					
Q1	-	-	-	-	-
Q2	-	-	-	-	-
Q3	-	-	-	-	-
Q4	-	-	-	-	-
Q5	+	+	-	-	+
Q6	-	-	-	-	-
Q8	+	+	-	+	-
3-hidroksi-2-piridinski					
JR585	+	+	-	-	-
JR595	-	-	+	+	-
GM415	+	+	+	+	+
GM113	+	+	+	-	+
GM508	+	+	-	-	+

(+) ima učinka na primarnu metu ili stanice, (-) nema učinka na primarnu metu ili stanice

Kod bispiridinijskih oksima u dizajnu novih protuotrova treba izbjegavati kombinaciju dvostruke veze u poveznici između dva piridinijska prstena uz prisutnost klorovih atoma (K867 i K870). Naime, uvođenje dvostruke veze u poveznicu između piridinijskih prstenova, rezultiralo je boljom reaktivacijom acetilkolinesteraze inhibirane organofosfatom tabunom (K203 > K048) i nije utjecalo na toksičnost^{94,122} (**tablica 4.1 i 5.1**). Dodatak klora u osnovnu strukturu bispiridinijskih oksima imao je za cilj povećanje lipofilnosti oksima kako bi oksim lakše prošao kroz membranu²⁴ i smanjenja pK_a vrijednosti oksimske skupine. Prisustvo obje

strukturne karakteristike u jednoj molekuli nije značajno doprinijelo afinitetu AChE i BChE za oksime, niti reaktivaciji fosfosiliranih kolinesteraza kao primarnih meta, u odnosu na oksime kod kojih je prisutna samo jedna od ovih karakteristika (K203, K868, K869), međutim djelovanju na stanice jest. Ova serija oksima uzrokovala je pokretanje procesa apoptoze putom ovisnom o mitohondriju, aktivacijom enzima kaspaze 9. Budući da su prema *in silico* analizama i dosadašnjim spoznajama bispiridinijevi oksimi okarakterizirani kao spojevi niskog potencijala pasivnog prolaza stanične membrane, njihov učinak na stanice najvjerojatnije je posljedica interakcije s nekim od specifičnih proteina stanične membrane kao što su acetilkolinski receptori^{99,198,199} ili receptori staničnog rasta ili posljedica djelovanja unutar stanice nakon aktivnog prijenosa putem nekog od kationskih transportera.

Kod imidazolijskih oksima u dizajnu novih protuotrova treba izbjegavati prisutnost dva supstituirana aromatska prstena na imidazolijskoj jezgri kao kod oksima VII i X. Promjene u strukturi nisu značajno utjecale na djelovanje na primarnu metu (**tablica 5.1**)²⁵, ali su utjecale na homeostazu stanica. Za razliku od piridinijevih oksima, imidazolijski oksimi VII i X uzrokovali su nereguliranu smrt stanice pucanjem stanične membrane uz oksidacijski stres i oštećenje mitohondrija. Uz to, djelovanje imidazolijskih oksima na stanice bilo je i sinergističko, što znači da je jedan potencirao djelovanje drugog, dok se njihovo djelovanje može pripisati interakciji sa specifičnim membranskim proteinima.

Nadalje, u dizajnu novih protuotrova prema strukturi kinuklidinijevih oksima treba izbjegavati prisutnost dugih alkilnih lanaca (dužih od C4) na kinuklidinijevoj jezgri, kao kod oksima Q5. Produljenje lanca doprinijelo je poboljšanju vezanja u aktivno mjesto kolinesteraza i utjecaju na homeostazu stanica, no nije utjecalo na reaktivaciju fosiliranih kolinesteraza (**tablica 5.1**)¹⁵⁶. Dodatak fenilne skupine, afinitet vezanja se smanjuje, no poboljšava se reaktivacija fosiliranih kolinesteraza te takvi oksimi nisu toksični (**tablica 4.2, tablica 5.1**). Za razliku od piridinijevih oksima, a slično imidazolijskim oksimima, uzrokovali su nereguliranu smrt stanice pucanjem stanične membrane uz oksidacijski stres i oštećenje mitohondrija, aktivaciju enzima kaspaze 8, putom receptora smrti. Također i kinuklidinijeva serija oksima okarakterizirana je kao skupina male vjerojatnosti pasivnog prolaska stanične membrane. Međutim, njihovo djelovanje se pripisuje interakciji sa specifičnim membranskim proteinima ili čak poremećajem fluidnosti ili propusnosti stanične membrane¹⁷⁹.

Prilikom dizajna novih 3-hidroksi-2-piridinskih oksima treba izbjegavati dodatak hidroizokinolinskog supstituenta kao kod oksima GM415, GM113 i GM508. Naime, ova

skupina oksima posebno je dizajnirana kako bi se efikasnije vezali u aktivno mjesto kolinesteraza²³. Prisutnost hidroizokinolinskog pobočnog ogranka nije značajno doprinijela učinkovitosti u djelovanju na primarne mete u odnosu na oksime kod kojih nije prisutna ova karakteristika (JR585 i JR595), međutim djelovanju na stanice jest (**tablica 5.1**). 3-hidroksi-2-piridinskih oksimi uzrokovali su pokretanje procesa apoptoze djelovanjem putem ovisnom o mitohondriju, aktivacijom enzima kaspaze 9 i putem receptora smrti, aktivacijom enzima kaspaze 8 te posljedično aktivacijom izvršne kaspaze 3 i oštećenjem DNA. Iako je ova serija oksima bez stalnog pozitivnog naboja sintetizirana i s ciljem visokog potencijala pasivnog prolaska kroz stanične membrane, prema predviđanjima i dosadašnjim spoznajama nemaju poželjne karakteristike za pasivan prolazak, a njihov učinak na stanice najvjerojatnije je posljedica interakcije s nekim od specifičnih proteina stanične membrane ili posljedica djelovanja unutar stanice nakon aktivnog prijenosa putem nekog od kationskih transportera.

Na kraju, primjenom ovakvog detaljnog pristupa analizi baziranog na staničnim testovima učinkovito je proveden probir spojeva i definirale su se smjernice za poboljšanje strukture oksima u dizajnu novih protuotrova za reaktivaciju fosfiliranih kolinesteraza, bez provođenja studija *in vivo*. Drugim riječima, u ovoj disertaciji, korištenjem testova *in vitro* temeljenih na stanicama pokazalo se da postoji povezanost strukture i toksičnosti oksima utvrđivanjem mehanizma odgovornog za određene patologije. Time su prikupljeni vrijedni podaci o djelovanju oksima na molekularnoj razini. Također, ovakav pristup može u ranoj fazi isključiti potencijalno toksične oksime čak i prije kinetičkih eksperimenata *in vitro*, što ujedno doprinosi smanjenju troškova analiza. Uz to, istraživanje se u budućnosti može proširiti i na nove farmakološke mete istaknute kao potencijalne mete djelovanja testiranih oksima.

§ 6. ZAKLJUČAK

- Učinci oksima na razini stanica povezani su sa specifičnim elementima u strukturi koji nisu nužni za njihovo primarno djelovanje, reaktivaciju fosfilirane acetilkolinesteraze te su definirane smjernice za poboljšanje strukture oksima prilikom dizajna novih reaktivatora.
- Kod bispiridinijevih oksima negativan utjecaj na stanice imala je kombinacija dvostruke veze u poveznici između dva prstena i prisutnosti klorovih supstituenata. Oksimi s ovom kombinacijom u strukturi uzrokuju pokretanje procesa regulirane stanične smrti, apoptoze, putom ovisnom o mitohondriju, aktivacijom enzima kaspaze 9 i MAPK kinaze te posljedično oštećenjem DNA. Zbog niskog potencijala pasivnog prolaska stanične membrane, učinak na stanice posljedica je interakcije sa specifičnim proteinima stanične membrane (npr. acetilkolinski receptori) ili posljedica djelovanja unutar stanice nakon aktivnog prijenosa putem nekog od kationskih transportera.
- Unutar strukture imidazolijevih oksima prilikom dizajna novih reaktivatora predlaže se izbjegavanje prisutnosti dva supstituirana aromatska prstena na imidazolijevoj jezgri. Oksimi s ovom kombinacijom u strukturi uzrokuju nereguliranu smrt stanice, nekrozu, pucanjem stanične membrane popraćenu oksidacijskim stresom, oštećenjem mitohondrija te smanjenom fosforilacijom izvanstanično reguliranih kinaza ERK1/2, uključenih u regulaciju diobe stanice. Nizak potencijal pasivnog prolaska stanične membrane pripisuje ove učinke interakciji sa specifičnim membranskim proteinima. Kao potencijalna nova meta djelovanja ovih oksima, predviđena molekulskim modeliranjem farmakofora, istaknuta je beta-sekretaza 1 (BACE1), s važnom ulogom u nastajanju amiloid- β peptida u slučaju Alzheimerove bolesti.
- Prilikom dizajna novih kinuklidinijevih oksima potrebno je izbjeći prisutnost dugih alkilnih lanaca (dužih od C4) na kinuklidinijevoj jezgri. Takvi oksimi uzrokuju nereguliranu smrt stanice, nekrozu, pucanjem stanične membrane popraćenu oksidacijskim stresom i oštećenjem mitohondrija, uz aktivaciju enzima kaspaze 8, putom receptora smrti. Nizak potencijal pasivnog prolaska stanične membrane pripisuje ove učinke interakciji sa specifičnim membranskim proteinima i/ili mogućoj interakciji takvih oksima s membranskim lipidima čime se remeti fluidnosti stanične membrane.

Molekulskim modeliranjem farmakofora izdvojena je nova potencijalna meta djelovanja ovih oksima – aldehyd dehidrogenaza A1 (ALDH1A1), čija aktivnost ima ulogu u Parkinsonovoj bolesti kroz metabolizam dopamina povećanjem razine toksičnih aldehyda.

- Na osnovu rezultata serije 3-hidroksi-2-piridinskih oksima, pri dizajnu novih reaktivatora predlaže se uklanjanje hidroizokinolinskog pobočnog ogranka. Prisutnost takve strukturne karakteristike uzrokuje pokretanje procesa regulirane stanične smrti, apoptoze, putom ovisnom o mitohondriju, aktivacijom enzima kaspaze 9 te posljedično aktivacijom izvršne kaspaze 3 i oštećenjem DNA. Mitohondriji i stanični metabolizam masnih kiselina vjerojatna su meta 3-hidroksi-2-piridinskih oksima, zbog povećane fosforilacije acetyl-CoA karboksilaze (ACC). Uz to, molekulskim modeliranjem farmakofora predviđena je inhibicija nove farmakološke mete – citokroma P450cam (CYP101) iz *Pseudomonas putida*, što sugerira mogućnost inhibicije i ostalih citokroma P450.

§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (prema potrebi)

Kratica	Značenje
7-AAD	7-aminoaktinomycin D
A-230	N-1-dietilaminoetilidenmetilfosfonoamijev fluorid
A-232	metil-1-dietilaminoetilidenfosforoamidofluoridat
A-234	etil-1-dietilaminoetilidefosforoamidofluoridat
A2B	prolazak spoja iz apikalnog na bazolateralnu stranu
ACC	acetyl-CoA-karboksilaza
ACh	acetilkolin
AChE	acetilkolinesteraza
ADMET	engl. <i>adsorption, distribution, metabolism, excretion, toxicology</i>
ALDH1A1	aldehid-dehidrogenaza A1
ATM	Ataxia telangiectasia mutirana kinaza
B2A	prolazak spoja na bazolateralne na apikalnu stranu
BACE1	beta-sekretaza 1
BChE	butirilkolinesteraza
CarbE	karboksiesteraza
CCCP	karbonilcijanidklorfenilhidrazon-perklorat
Cl_{int}	<i>in vitro</i> intrinzični klirens
CYP101	citokrom P450cam iz <i>Pseudomonas putide</i>
CYP1A	citokrom P450 1A
CYP2C19	citokrom P450 2C19
CYP2C9	citokrom P450 2C9
CYP2D6	citokrom P450 2D6
CYP3A4	citokrom P450 3A4
CYP450	citokrom P450
DCF	fluorecentni 2',7'-diklorofluorescin
DCFDA	2',7'-diklorfluorescein-diacetat

DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM F12	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i>
EMEM	engl. <i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
FasL	transmembranski protein tipa II iz obitelji faktora tumorske nekroze
FBS	fetalni goveđi serum
GA	etil-dimetilaminocijanofosfonat
GB	izopropil-metilfosfonofluoridat
GC	izopropil-metilfosfonokloridat
GD	3,3-dimetilbutan-2-il-metilfosfonofluoridat
GE	izopropil-etilfosfonofluoridat
GF	O-cikloheksil-metilfosfonofluoridat
GSH	reducirani oblik glutationa
GV	2-(dimetilamino)etil-dimetilfosforamidofluoridat
H2A.X	histon 2A.X
H ₂ DCF	nefluorecentni 2',7'-diklorofluorescin
HOAc	octena kiselina
HBA	broja akceptora vodikovih veza
HBD	broja donora vodikovih veza
HEK293	adherentne ljudske embrionalne stanice bubrega
HepG2	adherentne ljudske stanice jetre
HK-2	adherentne ljudske stanice bubrega odraslih
HS-6	([{3-karbamoilpiridinio}metoksi]metil)-2- ([hidroksiimino]metil)piridinijeva sol
IgG	imunoglobulina klase G
LBF	relativni hepatički klirens
LDH	laktat-dehidrogenaza
LOAEL	najniža doza pri kojoj je uočen štetan učinak

logD	koeficijenta lipofilnosti pri pH 7,4
logP	koeficijent lipofilnosti
Mr	molekulska masa
MAPK	MAP kinaza
MCB	monoklorobiman
MDCK	Madin-Darby pseće epitelne stanice bubrega
MDCKII-MDR1	MDCK stanice koje pojačano eksprimiraju ljudski gen za otpornost na različite lijekove
MeOH	metanol
MMB-4	1,1'-metilenbis[4-(hidroksiimino)metil]piridinijska sol
MRM	engl. <i>multiple reaction monitoring</i>
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-tetrazolijeva sol
NADH	reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida
NADPH	reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NAF	natrijev fluorid
NTE	esteraza povezana s neuropatskim djelovanjem OP spojeva
OP	organofosforni spoj
OPCW	Organizacija za zabranu kemijskog oružja
p-ACC	fosforilirana acetyl-CoA-karboksilaza
P_{app}	prividna propusnost membrane
PBS	fosfatni pufer
p-ERK	fosforilirana kinaza regulirana vanjskim signalom
P-gp	P-glikoprotein
pK_a	kiselo-bazna konstanta disocijacije
PMS	fenazin-metosulfat
PMSF	fenilmetansulfonil-fluorid
pNF κ B p65	fosforilirani faktor nekroze κ a-B u kompleksu s proteinom p65
p-p38 MAPK	fosforilirana protein kinaza aktivirana mitogenom
p-STAT3	fosforilirani prijenosnik signala i transkripcijski faktor 3
RB	broj veza koje se rotiraju

ROS	reaktivne kisikove vrste
RS194B	<i>N</i> -2-(azepan-1-il)etil-2-(hidroksiimino)acetamid
SDS	natrijev dodecil sulfat
SH-SY5Y	adherentne ljudske stanice neuroblastoma
SS	staurosporin
$t_{1/2}$	poluvrijeme metaboličke razgradnje spoja
tBOOH	<i>tert</i> -butilvodikov peroksid
TBS	Tris pufer
TBST	Tris pufer s Tween® 20
TEPP	tetraetil-pirofosfat
THP-1	suspenzijske ljudska stanice monocita
TMB-4	4-[(hidroksiimin)metil]-1-(3-{4-[(hidroksiimin)metil]piridinio}propil)piridinijev dibromid
TMRE	etilni ester tetrametilrodaminperklorata
TNF α	faktor nekroze tumora alfa
TPSA	područje polarne površine
VE	<i>S</i> -2-dietilaminoetil- <i>O</i> -etil-etilfosfonotioat
VG	<i>S</i> -2-dietilaminoetil- <i>O,O</i> -dietil-fosforotioat
VGFR	vaskularni endotelni faktor rasta
VM	<i>S</i> -2-dietilaminoetil- <i>O</i> -etil-metilfosfonotioat
VP	piridin-3-il-(3,3,5-trimetilcikloheksil)-metilfosfonat
VR	<i>S</i> -2-dietilaminoetil- <i>O</i> -izobutil-metilfosfonotioat
VS	<i>S</i> -2-diizopropilaminoetil- <i>O</i> -etil-etilfosfonotioat
VX	<i>S</i> -2-diizopropilaminoetil- <i>O</i> -etil-metilfosfonotioat
XI	1-(3-klorobenzil)-2-[(hidroksiimino)metil]-3-(4-metilbenzil)imidazolijev bromid
XT MES	pufer s 2-(<i>N</i> -morfolino)etansulfonskom kiselinom
$\Delta\Psi_m$	mitohondrijski membranski potencijal

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. H. G. Vogel, J. Maas, F. J. Hock i D. Mayer, *Drug discovery and evaluation: Safety and pharmacokinetic assays*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2013.
2. R. C. Gupta, *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. San Diego, California: Academic Press, 2005.
3. R. Krieger, *Handbook of Pesticide Toxicology*. San Diego, California: Academic Press Inc, 2001.
4. P. Eyer, The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning, *Toxicol. Rev.* **22** (2003) 165–190.
5. R. C. Gupta, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, San Diego, California: Academic Press, 2015.
6. E. Dolgin, Syrian gas attack reinforces need for better anti-sarin drugs, *Nat. Med.* **19** (2013) 1194–1195.
7. T. Nakagawa i A. T. Tu, Murders with VX: Aum Shinrikyo in Japan and the assassination of Kim Jong-Nam in Malaysia, *Forensic Toxicol.* **36** (2018) 542–544.
8. E. Gillon, J. Renou, G. Mercey, T. Verdelet, E. Pa, M. Arboléas, M. Loiodice, M. Kliachyna, R. Baati, F. Nachon, L. Jean i P.-Y. Renard, Syntheses and *in vitro* evaluations of uncharged reactivators for human acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents, *Chem. Biol. Interact.* **203** (2013) 81–84.
9. L. Gorecki, L. Junova, T. Kucera, V. Hepnarova, L. Prchal, T. Kobrlova, L. Muckova, O. Soukup i J. Korabecny, Tacroximes: Novel unique compounds for the recovery of organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase, *Future Med. Chem.* **11** (2019) 2625–2634.
10. Z. Wei, Y.-Q. Liu, X.-B. Zhou, Y. Luo, C.-Q Huang, Y.-A. Wang, Z.-B. Zheng i S. Li, New efficient imidazolium aldoxime reactivators for nerve agent-inhibited acetylcholinesterase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24** (2014) 5743–5748.
11. S. Berend, M. Katalinić, A. Lucić Vrdoljak, Z. Kovarik, K. Kuča i B. Radić, *In vivo* experimental approach to treatment against tabun poisoning, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **25** (2010) 531–536.

12. M. Katalinić, N. M. Hrvat, J. Ž. Karasová, J. Misik i Z. Kovarik, Translation of *in vitro* to *in vivo* pyridinium oxime potential in tabun poisoning, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **66** (2015) 291–298.
13. S. Žunec, B. Radić, K. Kuča, K. Musilek i A. Lucić Vrdoljak, Comparative determination of the efficacy of bispyridinium oximes in paraoxon poisoning, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **66** (2015) 129–134.
14. Z. Kovarik, N. Maček Hrvat, M. Katalinić, R. K. Sit, A. Paradyse, S. Žunec, K. Musilek, V. V. Fokin, P. Taylor i Z. Radić, Catalytic soman scavenging by the Y337A/F338A acetylcholinesterase mutant assisted with novel site-directed aldoximes, *Chem. Res. Toxicol.* **28** (2015) 1036–1044.
15. J. Zdarova Karasova, J. Kvetina, I. Tacheci, V. Radochova, K. Musilek, K. Kuca i J. Bures, Pharmacokinetic profile of promising acetylcholinesterase reactivators K027 and K203 in experimental pigs, *Toxicol. Lett.* **273** (2017) 20–25.
16. M. Kuneš, J. Květina, J. Bureš, J. Ž. Karasová, M. Pavlík, I. Tachecí, K. Musílek i K. Kuca, HI-6 oxime (an acetylcholinesterase reactivator): Blood plasma pharmacokinetics and organ distribution in experimental pigs, *Neuroendocrinol. Lett.* **35** (2014) 191–196.
17. K. Neumaier, F. Worek, H. Thiermann i T. Wille, Bispyridinium non-oximes: An evaluation of cardiac effects in isolated hearts and smooth muscle relaxing effects in jejunum, *Toxicol. Vit.* **35** (2016) 11–16.
18. V. Jačević, E. Nepovimova i K. Kuča, Toxic Injury to Muscle Tissue of Rats Following Acute Oximes Exposure, *Sci. Rep.* **9** (2019) 1457.
19. W. D. Dettbarn, D. Milatovic i R. C. Gupta, Oxidative stress in anticholinesterase induced excitotoxicity, R. C. Gupta (ur.), *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*, Amsterdam, Elsevier Academic Press, 2005., str. 511–530.
20. M. Abdollahi i S. Karami-Mohajeri, A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **258** (2012) 309–314.
21. N. Maraković, A. Knežević, V. Vinković, Z. Kovarik i G. Šinko, Design and synthesis of N-substituted-2-hydroxyiminoacetamides and interactions with cholinesterases, *Chem. Biol. Interact.* **259** (2016) 122–132.
22. M. Kliachyna, G. Santoni, V. Nussbaum, J. Renou, B. Sanson, J. P. Colletier, M. Arboléas,

- M. Loiodice, M. Weik, L. Jean, P. Y. Renard, F. Nachon i R. Baati, Design, synthesis and biological evaluation of novel tetrahydroacridine pyridine-aldoxime and -amidoxime hybrids as efficient uncharged reactivators of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase, *Eur. J. Med. Chem.* **78** (2014) 455–467.
23. T. Zorbaz, A. Braiki, N. Maraković, J. Renou, E. de la Mora, N. Maček Hrvat, M. Katalinić, I. Silman, J. L. Sussman, G. Mercey, C. Gomez, R. Mougeot, B. Pérez, R. Baati, F. Nachon, M. Weik, L. Jean, Z. Kovarik i P. Y. Renard, Potent 3-Hydroxy-2-Pyridine Aldoxime Reactivators of Organophosphate-Inhibited Cholinesterases with Predicted Blood–Brain Barrier Penetration, *Chem. - A Eur. J.* **24** (2018) 9675–9691.
24. T. Zorbaz, D. Malinak, N. Maraković, N. Maček Hrvat, A. Zandona, M. Novotny, A. Skarka, R. Andrys, M. Benkova, O. Soukup, M. Katalinić, K. Kuca, Z. Kovarik i K. Musilek, Pyridinium oximes with *ortho*-positioned chlorine moiety exhibit improved physicochemical properties and efficient reactivation of human acetylcholinesterase inhibited by several nerve agents, *J. Med. Chem.* **61** (2018) 10753–10766.
25. M. Katalinić, N. Maček Hrvat, K. Baumann, S. Morasi Piperčić, S. Makarić, S. Tomić, O. Jović, T. Hrenar, A. Miličević, D. Jelić, S. Žunec, I. Primožič i Z. Kovarik, A comprehensive evaluation of novel oximes in creation of butyrylcholinesterase-based nerve agent bioscavengers, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **310** (2016) 195–204.
26. H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore i J. Darnell, Overview of Extracellular Signaling, *Molecular Cell Biology*, New York, Freeman, W. H, 2000.
27. A. Bosak, Organophosphorus compounds: Classification and enzyme reactions, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **57** (2006) 445–457.
28. F. Worek, H. Thiermann i T. Wille, Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair, *Chem. Biol. Interact.* **259** (2016) 93–98.
29. S. Soares, T. Rosado, M. Barroso, D. N. Vieira i E. Gallardo, Organophosphorus pesticide determination in biological specimens: bioanalytical and toxicological aspects, *Int. J. Legal Med.* **133** (2019) 1763–1784.
30. A. Marklund, B. Andersson i P. Haglund, Traffic as a source of organophosphorus flame retardants and plasticizers in snow, *Environ. Sci. Technol.* **39** (2005) 3555–3562.
31. S. Suratman, J. W. Edwards i K. Babina, Organophosphate pesticides exposure among farmworkers: Pathways and risk of adverse health effects, *Rev. Environ. Health* **30** (2015)

- 65–79.
32. A. Watson, D. Opresko, R. a. Young, V. Hauschild, J. King i K. Bakshi, Organophosphate Nerve Agents, R. C. Gupta (ur.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Academic Press, 2015, str. 87–111.
 33. G. A. Petroianu, Synthesis of tetraethyl pyrophosphate (TEPP): from physician Abbot and pharmacist Riegel to chemist Nylen, *Pharmazie* **70** (2015) 427–434.
 34. J. E. Casida i G. B. Quistad, Golden age of insecticide research: Past, present, or future?, *Annu. Rev. Entomol.* **43** (1998) 1–16.
 35. J. G. Konrad, G. Chesters i D. E. Armstrong, Soil degradation of malathion, a phosphorodithioate insecticide, *Soil Sci. Soc. Am. J.* **33(2)** (1969) 259–262.
 36. M. Eddleston, L. Karalliedde, N. Buckley, R. Fernando, G. Hutchinson, G. Isbister, F. Konradsen, D. Murray, J. C. Piola, N. Senanayake, R. Sheriff, S. Singh, S. B. Siwach i L. Smit, Pesticide poisoning in the developing world - A minimum pesticides list, *Lancet* **360** (2002) 1163–1167.
 37. P. Aas, T. A. Veiteberg i F. Fonnum, Acute and sub-acute inhalation of an organophosphate induce alteration of cholinergic muscarinic receptors, *Biochem. Pharmacol.* **36** (1987) 1261–1266.
 38. A. Tuomainen, J. A. Kangas, W. J. A. Meuling i R. C. Glass, Monitoring of pesticide applicators for potential dermal exposure to malathion and biomarkers in urine, *Toxicol. Lett.* **134** (2002) 125–132.
 39. F. Worek, T. Wille, M. Koller i H. Thiermann, Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat, *Arch. Toxicol.* **90** (2016) 2131–2145.
 40. J. E. Chambers i E. L. Patricia, *Organophosphates: chemistry, fate and effects*. Academic Press Inc, 1992.
 41. S. W. Wiener i R. S. Hoffman, Nerve agents: A comprehensive review, *J. Intensive Care Med.* **19** (2004) 22–37.
 42. R. T. Delfino, T. S. Ribeiro i J. D. Figueroa-Villar, Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: A review, *J. Braz. Chem. Soc.* **20** (2009) 407–428.
 43. T. M. Shih, S. M. Duniho i J. H. McDonough, Control of nerve agent-induced seizures is critical for neuroprotection and survival, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **188** (2003) 69–80.
 44. J. Bajgar, J. Fusek, J. Kassa, K. Kuca i D. Jun, Global impact of chemical warfare agents

- used before and after 1945, R. C. Gupta (ur.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Academic Press, 2015, str. 17–25.
45. T. C. C. Franca, D. A. S. Kitagawa, S. F. d. A. Cavalcante, J. A. V. da Silva, E. Nepovimova i K. Kuca, Novichoks: The dangerous fourth generation of chemical weapons, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019).
46. M. Kloske i Z. Witkiewicz, Novichoks – The A group of organophosphorus chemical warfare agents, *Chemosphere* **221** (2019) 672–682.
47. E. Nepovimova i K. Kuca, The history of poisoning: from ancient times until modern ERA, *Arch. Toxicol.* **93** (2019) 11–24.
48. Chemical Weapons Convention.; Preuzeto od <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention> (preuzeto 11. travnja 2020.)
49. J. A. Vale, T. C. Marrs i R. L. Maynard, Novichok: a murderous nerve agent attack in the UK, *Clin. Toxicol.* **56** (2018) 1093–1097.
50. H. John, F. Balszuweit, K. Kehe, F. Worek i H. Thiermann, Toxicokinetic Aspects of Nerve Agents and Vesicants, R. C. Gupta (ur.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Academic Press, 2015, str. 817–856.
51. M. F. Woode i A. S. Wright, Alkylation of DNA by Organophosphorus Pesticides, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)* **49** (1981) 51–55.
52. J. Tafuri i J. Roberts, Organophosphate poisoning, *Ann Emerg Med* **16** (1987) 193–202.
53. P. Taylor i Z. Radić, The cholinesterases: from genes to proteins, *J. Biol. Chem.* **266** (1994) 4025–4028.
54. M. Q. Daniel, Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states, *Chem. Rev.* **87** (1987) 955–979.
55. J. H. McDonough i T. M. Shih, Neuropharmacological Mechanisms of Nerve Agent-induced Seizure and Neuropathology, *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21** (1997) 559–579.
56. S. R. Chebabo, M. D. Santos i E. X. Albuquerque, The organophosphate sarin, at low concentrations, inhibits the evoked release of GABA in rat hippocampal slices, *Neurotoxicology* **20** (1999) 871–882.
57. G. Lallement, P. Carpentier, I. Pernot-Marino, D. Baubichon, A. Collet i G. Blanchet, Involvement of the different rat hippocampal glutamatergic receptors in development of seizures induced by soman: an autoradiographic study, *Neurotoxicology* **12** (1991) 655–

- 664.
58. M. A. Brown i K. A. Brix, Review of health consequences from high-, intermediate- and low-level exposure to organophosphorus nerve agents, *J. Appl. Toxicol.* **18** (1998) 393–408.
59. J. L. De Bleecker, J. L. De Reuck i J. L. Willems, Neurological aspects of organophosphate poisoning, *Clin. Neurol. Neurosurg.* **94** (1992) 93–103.
60. J. Newmark, Therapy for acute nerve agent poisoning: An update, *Neurol. Clin. Pract.* **9** (2019) 337–342.
61. E. J. Hulse, J. D. Haslam, S. R. Emmett i T. Woolley, Organophosphorus nerve agent poisoning: managing the poisoned patient, *Br. J. Anaesth.* **123** (2019) 457–463.
62. D. R. Haubrich i T. J. Chippendale, Regulation of acetylcholine synthesis in nervous tissue **20** (1977) 1465–1478.
63. H. Smulyan, The beat goes on: The story of five ageless cardiac drugs, *Am. J. Med. Sci.* **356** (2018) 441–450.
64. S. Scholtz, L. MacMorris, F. Krogmann i G. U. Auffarth, Poisons, drugs and medicine: On the use of atropine and scopolamine in medicine and ophthalmology: An historical review of their applications, *J. Eye Study Treat.* **2019** (2019) 51–58.
65. Atropine Side Effects.; Preuzeto od <https://www.drugs.com/sfx/atropine-side-effects.html> (preuzeto 25. svibnja 2020.)
66. T. M. Shih i J. H. McDonough, Organophosphorus Nerve Agents-Induced Seizures and Efficacy of Atropine Sulfate as Anticonvulsant Treatment, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **64** (1999) 147–153.
67. L. H. Sternbach, The discovery of Librium, *Agents Actions* **2** (1972) 193–196.
68. L. P. Longo i B. Johnson, Addiction: Part I. Benzodiazepines--side effects, abuse risk and alternatives, *Am. Acad. Fam. Physicians* **61** (2000) 2121–2128.
69. J. Y. Wick, The history of benzodiazepines, *Consult. Pharm.* **28** (2013) 538–548.
70. H. Ashton, The diagnosis and management of benzodiazepine dependence, *Curr. Opin. Psychiatry* **18** (2005) 249–255.
71. A. Schmitz, Benzodiazepine use, misuse, and abuse: A review, *Ment. Heal. Clin.* **6** (2016) 120–126.
72. F. Worek, T. Wille, M. Koller i H. Thiermann, Structural requirements for effective

- oximes-evaluation of kinetic *in vitro* data with phosphylated human AChE and structurally different oximes., *Chem. Biol. Interact.* **203** (2013) 125–128.
73. N. Maček Hrvat, T. Zorbaz, G. Šinko i Z. Kovarik, The estimation of oxime efficiency is affected by the experimental design of phosphylated acetylcholinesterase reactivation, *Toxicol. Lett.* **293** (2018) 222–228.
74. H. Thiermann, N. Aurbek i F. Worek, Treatment of Nerve Agent Poisoning, *Chemical Warfare Toxicology: Volume 2: Management of Poisoning*, Royal Society of Chemistry 2016, str. 1–42.
75. I. B. Wilson i S. Ginsburg, A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase, *BBA - Biochim. Biophys. Acta* **18** (1955) 168–170.
76. M. Jokanović i M. P. Stojiljković, Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning, *Eur. J. Pharmacol.* **553** (2006) 10–17.
77. M. P. Stojiljković i M. Jokanović, Pyridinium oximes: Rationale for their selection as causal antidotes against organophosphate poisonings and current solutions for auto-injectors, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **57** (2006) 435–443.
78. P. Eyer, I. Hagedorn, R. Klimmek, P. Lippstreu, M. Löffler, H. Oldiges, U. Spöhrer, I. Steidl, L. Szinicz i F. Worek, HLö 7 dimethanesulfonate, a potent bispyridinium-dioxime against anticholinesterases, *Arch. Toxicol.* **66** (1992) 603–621.
79. M. Jokanović, Pyridinium oximes in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds, R. C. Gupta (ur.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Academic Press, 2015, str. 1057–1070).
80. F. Worek i H. Thiermann, The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds, *Pharmacol. Ther.* **139** (2013) 249–259.
81. F. Worek, P. Eyer, N. Aurbek, L. Szinicz i H. Thiermann, Recent advances in evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning by *in vitro* analysis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **219** (2007) 226–234.
82. K. Kuča, J. Cabal i J. Kassa, A comparison of the efficacy of a bispyridinium oxime - 1,4-bis-(2-hydroxyiminomethylpyridinium) butane dibromide and currently used oximes to reactivate sarin, tabun or cyclosarin-inhibited acetylcholinesterase by *in vitro* methods, *Pharmazie* **59** (2004) 795–798.

83. D. J. Ecobichon, A. M. Comeau, W. M. O'Neil i W. D. Marshall, Kinetics, distribution, and biotransformation of the chemical HI-6 in the rat, dog, and rhesus monkey, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **68** (1990) 614–621.
84. B. Benkő, H. Kalász, K. Ludányi, G. Petroianu, K. Kuca, F. Darvas i K. Tekes, *In vitro* and *in vivo* metabolisms of K-48, *Anal. Bioanal. Chem.* **389** (2007) 1243–1247.
85. T. Zorbaz, P. Mišetić, N. Probst, S. Žunec, A. Zandona, G. Mendaš, V. Micek, N. Maček Hrvat, M. Katalinić, A. Braiki, L. Jean, P. Y. Renard, V. Gabelica Marković i Z. Kovarik, Pharmacokinetic evaluation of brain penetrating morpholine-3-hydroxy-2-pyridine oxime as an antidote for nerve agent poisoning, *ACS Chem. Neurosci.* **11** (2020) 1072–1084.
86. G. Cassel, L. Karlsson, L. Waara, K. W. Ang i A. Göransson-Nyberg, Pharmacokinetics and effects of HI-6 in blood and brain of soman-intoxicated rats: A microdialysis study, *Eur. J. Pharmacol.* **332** (1997) 43–52.
87. D. E. Lorke, H. Kalasz, G. A. Petroianu i K. Tekes, Entry of oximes into the brain: A review, *Curr. Med. Chem.* **15** (2008) 743–753.
88. N. Maček Hrvat, J. Kalisiak, G. Šinko, Z. Radić, K. B. Sharpless, P. Taylor i Z. Kovarik, Evaluation of high-affinity phenyltetrahydroisoquinoline aldoximes, linked through anti-triazoles, as reactivators of phosphorylated cholinesterases, *Toxicol. Lett.* **321** (2020) 83–89.
89. I. Primožič, R. Odžak, S. Tomić, V. Simeon-Rudolf i E. Reiner, Pyridinium, imidazolium, and quinuclidinium oximes: Synthesis, interaction with native and phosphorylated cholinesterases, and antidotes against organophosphates, *J. Med. Chem.* **2** (2004) 1–30.
90. K. Musilek, M. Dolezal, F. Gunn-Moore i K. Kuca, Design, evaluation and structure-activity relationship studies of the AChE reactivators against organophosphorus pesticides, *Med. Res. Rev.* **31** (2009) 548–575,.
91. K. Kuca, D. Jun, J. Cabal i L. Musilova, Bisquaternary oximes as reactivators of tabun-inhibited human brain cholinesterases: An *in vitro* study, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **101** (2007) 25–28.
92. K. Kuca, D. Jun i K. Musilek, Structural requirements of scetylcholinesterase reactivators, *Mini-Reviews Med. Chem.* **6** (2006) 269–277.
93. M. Čalić, A. Bosak, K. Kuča i Z. Kovarik, Interactions of butane, but-2-ene or xylene-like linked bispyridinium para-aldoximes with native and tabun-inhibited human cholinesterases, *Chem. Biol. Interact.* **175** (2008) 305–308.

94. Z. Kovarik, A. Lucić Vrdoljak, S. Berend, M. Katalinić, K. Kuca, K. Musilek i B. Radić, Evaluation of oxime K203 as antidote in tabun poisoning, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **60** (2009) 19–26.
95. M. C. De Koning, M. J. A. Joosen, D. Noort, A. Van Zuylen i M. C. Tromp, Peripheral site ligand-oxime conjugates: A novel concept towards reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase, *Bioorganic Med. Chem.* **19** (2011) 588–594.
96. G. E. Garcia, A. J. Campbell, J. Olson, D. Moorad-Doctor i V. I. Morthole, Novel oximes as blood-brain barrier penetrating cholinesterase reactivators, *Chem. Biol. Interact.* **187** (2010) 199–206.
97. H. C. Jeong, N. J. Park, C. H. Chae, K. Musilek, J. Kassa, K. Kuca i Y. S. Jung, Fluorinated pyridinium oximes as potential reactivators for acetylcholinesterases inhibited by paraoxon organophosphorus agent, *Bioorganic Med. Chem.* **17** (2009) 6213–6217.
98. R. K. Sit, Z. Kovarik, N. Maček Hrvat, S. Zunec, C. Green, V. V. Fokin, K. Barry Sharpless, Z. Radic i P. Taylor, Pharmacology, pharmacokinetics, and tissue disposition of zwitterionic hydroxyiminoacetamido alkylamines as reactivating antidotes for organophosphate exposure, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **367** (2018) 363–372.
99. A. Zandona i M. Katalinić, Nicotinic acetylcholine receptors: Diversity and physiological importance for neurodegenerative disorders and development of organophosphate antidotes, *Period. Biol.* **121–122** (2020) 115–128.
100. L. Bazina, A. Maravić, L. Krce, B. Soldo, R. Odžak, V. B. Popović, I. Aviani, I. Primožič i M. Šprung, Discovery of novel quaternary ammonium compounds based on quinuclidine-3-ol as new potential antimicrobial candidates, *Eur. J. Med. Chem.* **163** (2019) 626–635.
101. H. R. Schmidt, Z. Radić, P. Taylor i E. A. Fradinger, Quaternary and tertiary aldoxime antidotes for organophosphate exposure in a zebrafish model system, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **284** (2015) 197–203.
102. M. A. Malfatti, H. A. Enright, N. A. Be, E. A. Kuhn, S. Hok, M. W. McNerney, V. Lao, T. H. Nguyen, F. C. Lightstone, T. S. Carpenter, B. J. Bennion i C. A. Valdez, The biodistribution and pharmacokinetics of the oxime acetylcholinesterase reactivator RS194B in guinea pigs, *Chem. Biol. Interact.* **277** (2017) 159–167.
103. Y. J. Rosenberg, J. Wang, T. Ooms, N. Rajendran, L. Mao, X. Jiang, J. Lees, L. Urban, J.

- D. Momper, Y. Sepulveda, Y. J. Shyong i P. Taylor, Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reactivates and reverses advanced symptoms of lethal inhaled paraoxon in macaques, *Toxicol. Lett.* **293** (2018) 229–234.
104. New Clarivate Analytics report shows the cost to bring a drug to market has decreased to under \$2B for the first time in over five years.; Preuzeto od <https://clarivate.com/news/new-clarivate-analytics-report-shows-the-cost-to-bring-a-drug-to-market-has-decreased-to-under-2b-for-the-first-time-in-over-five-years/> (preuzeto 20. svibnja 2020)
105. A. Sertkaya, H. H. Wong, A. Jessup i T. Beleche, Key cost drivers of pharmaceutical clinical trials in the United States, *Clin. Trials* **13** (2016) 117–126.
106. H. Matthews, J. Hanison i N. Nirmalan, „Omics“-informed drug and biomarker discovery: Opportunities, challenges and future perspectives, *Proteomes* **4** (2016) 1–12.
107. J. Zurdo, Developability assessment as an early de-risking tool for biopharmaceutical development, *Pharm. Bioprocess.* **1** (2013) 29–50.
108. C. A. Umscheid, D. J. Margolis i C. E. Grossman, Key concepts of clinical trials: A narrative review, *Postgrad. Med.* **123** (2011) 194–204.
109. Step 2: Preclinical Research.; <https://www.fda.gov/node/365712> (preuzeto 20. ožujka 2021.)
110. Step 3: Clinical Research.; Preuzeto od <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-3-clinical-research> (preuzeto 20. ožujka 2021.)
111. R. Dresser, First-in-human trial participants: Not a vulnerable population, but vulnerable nonetheless, *J. Law, Med. Ethics* **37** (2009) 38–50.
112. M. Crul, H. Rosing, G. J. De Klerk, R. Dubbelman, M. Traiser, S. Reichert, N. G. Knebel, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen i W. W. Ten Bokkel Huinink, Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours, *Eur. J. Cancer* **38** (2002) 1615–1621.
113. J. F. Jin, L. L. Zhu, M. Chen, H. M. Xu, H. F. Wang, X. Q. Feng, X. P. Zhu i Q. Zhou, The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection, *Patient Prefer. Adherence* **9** (2015) 923–942.
114. Step 4: FDA Drug Review; <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-4-fda-drug-review> (preuzeto 20. ožujka 2021.)

115. P. Corr i D. Williams, The Pathway from Idea to Regulatory Approval: Examples for Drug Development, B. Lo i M. J. Field (ur.), *Conflict of Interest in Medical Research, Education, and Practice*, National Academies Press, 2009, str. 358–375.
116. Step 5: FDA Post-Market Drug Safety Monitoring.; Preuzeto od <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-5-fda-post-market-drug-safety-monitoring> (preuzeto 20. ožujka 2021.)
117. V. A. Voicu, H. Thiermann, F. Ş. Rădulescu, C. Mircioiu i D. S. Miron, The Toxicokinetics and Toxicodynamics of Organophosphonates versus the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oxime Antidotes: Biological Consequences, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **106** (2010) 73–85.
118. Z. Kovarik, M. Čalić, A. Bosak, G. Šinko i D. Jelić, *In vitro* Evaluation of aldoxime interactions with human scetylcholinesterase, *Croat. Chem. Acta* **81** (2008) 47–57.
119. Z. Kovarik, M. Katalinić, G. Šinko, J. Binder, O. Holas, Y. S. Jung, L. Musilova, D. Jun i K. Kuča, Pseudo-catalytic scavenging: Searching for a suitable reactivator of phosphorylated butyrylcholinesterase, *Chem. Biol. Interact.* **187** (2010) 167–171.
120. F. Ekström, Y. P. Pang, M. Boman, E. Artursson, C. Akfur i S. Börjegen, 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** (2006) 597–607.
121. B. M. Askew, Oximes and hydroxamic acids as antidotes in anticholinesterase poisoning, *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **11** (1956) 417–423.
122. M. Čalić, A. L. Vrdoljak, B. Radić, D. Jelić, D. Jun, K. Kuča i Z. Kovarik, *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** (2006) 85–96.
123. B. Calesnick, J. A. Christensen i M. Richter, Human toxicity of various oximes, *Arch. Environ. Health* **15** (1967) 599–608.
124. G. Krishna i S. Goel, Alternative animal toxicity testing of chemical warfare agents, R. C. Gupta (ur.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, San Diego, California, Academic Press, 2015, str. 657–673.
125. D. Steinritz, F. Eyer, F. Worek, H. Thiermann i H. John, Repetitive obidoxime treatment

- induced increase of red blood cell acetylcholinesterase activity even in a late phase of a severe methamidophos poisoning: A case report, *Toxicol. Lett.* **244** (2016) 121–123.
126. H. Thiermann, U. Mast, R. Klimmek, P. Eyer, A. Hibler, R. Pfab, N. Felgenhauer i T. Zilker, Cholinesterase status, pharmacokinetics and laboratory findings during obidoxime therapy in organophosphate poisoned patients, *Hum. Exp. Toxicol.* **16** (1997) 473–480.
127. M. Katalinić, K. Miš, S. Pirkmajer, Z. Grubič, Z. Kovarik i T. Marš, The cholinergic and non-cholinergic effects of organophosphates and oximes in cultured human myoblasts, *Chem. Biol. Interact.* **203** (2013) 144–148.
128. A. Ring, B. O. Strom, S. R. Turner, C. M. Timperley, M. Bird, A. C. Green, J. E. Chad, F. Worek i J. E. H. Tattersall, Bispyridinium compounds inhibit both muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in human cell lines, *PLoS One* **10** (2015) 1–16.
129. J. Fan i I. A. M. De Lannoy, Pharmacokinetics, *Biochem. Pharmacol.* **87** (2014) 93–120.
130. M. J. Gómez-Lechón, J. V. Castell i M. T. Donato, Hepatocytes-the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: *In vitro* variability as a reflection of *in vivo*, *Chem. Biol. Interact.* **168** (2007) 30–50.
131. T. A. Baillie, Metabolism and toxicity of drugs. Two decades of progress in industrial drug metabolism, *Chem. Res. Toxicol.* **21** (2008) 129–137.
132. J. A. Timbrell, *Principles of Biochemical Toxicology*, CRC Press, 2008.
133. J. MacArthur Clark, The 3Rs in research: A contemporary approach to replacement, reduction and refinement, *Br. J. Nutr.* **120** (2018) S1–S7.
134. G. G. Gračner, N. Lončarić, J. B. Špoljar, A. Dovč, K. Fuš, D. Gračner i Ž. Pavičić, 3R načelo u zaštiti dobrobiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe - jučer, danas, sutra, *Vet. stanica* **50** (2019) 63–73.
135. G. Pedersen, Development, validation and implementation of an *in vitro* model for the study of metabolic and immune function in normal and inflamed human colonic epithelium, *Dan. Med. J.* **60** (2015) B4973.
136. R. Song, Q. Shi, P. Yang i R. Wei, *In vitro* membrane damage induced by half-fin anchovy hydrolysates/glucose Maillard reaction products and the effects on oxidative status *in vivo*, *Food Funct.* **9** (2018) 785–796.
137. M. Mirzaei, S. Mirdamadi, M. Safavi, D. Zare, M. Hadizadeh i M. M. Asadi, Synthesis, *in vitro* and cellular antioxidant activity evaluation of novel peptides derived from

- Saccharomyces cerevisiae* protein hydrolysate: structure–function relationship: Antioxidant activity and synthetic peptides, *Amino Acids* **51** (2019) 1167–1175.
138. E. Zeiger, The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **841** (2019) 43–48.
139. R. Mateuca, N. Lombaert, P. V. Aka, I. Decordier i M. Kirsch-Volders, Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie* **88** (2006) 1515–1531.
140. A. L. Niles, R. A. Moravec i T. L. Riss, Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development, *Expert Opin. Drug Discov.* **3** (2008) 655–669.
141. W. Liu, Y. Deng, Y. Liu, W. Gong i W. Deng, Stem cell models for drug discovery and toxicology studies, *J Biochem Mol Toxicol* **27** (2013) 17–27.
142. J. R. Masters, HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly, *Nat. Rev. Cancer* **2** (2002) 311–315.
143. B. P. Lucey, W. A. Nelson-Rees i G. H. Hutchins, Henrietta Lacks, HeLa Cells, and cell culture contamination, *Arch Pathol Lab Med* **133** (2009) 1463–1467.
144. J. Lacoste, Research in rare disease: From genomics to proteomics, *Assay Drug Dev. Technol.* **16** (2018) 12–14.
145. S. Yoon, S. Han, K. J. Jeon i S. Kwon, Effects of collected road dusts on cell viability, inflammatory response, and oxidative stress in cultured human corneal epithelial cells, *Toxicol. Lett.* **284** (2018) 152–160.
146. R. Tacutu, D. Thornton, E. Johnson, A. Budovsky, Di. Barardo, T. Craig, E. Diana, G. Lehmann, D. Toren, J. Wang, V. E. Fraifeld i J. P. De Magalhães, Human ageing genomic resources: New and updated databases, *Nucleic Acids Res.* **46** (2018) D1083–D1090.
147. M. Arora, Cell Culture Media: A Review, *Mater. Methods* **3** (2013) 1–29.
148. Y. Fang i R. M. Eglen, Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development, *SLAS Discov.* **22** (2017) 456–472.
149. S. Kletting, S. Barthold, U. Repnik, G. Griffiths, B. Loretz, N. Schneider-Daum, C. de S. Carvalho-Wodarz i C. M. Lehr, Co-culture of human alveolar epithelial (hAELVi) and macrophage (THP-1) cell lines, *Altern. to Anim. Exp.* **35** (2018) 211–222.
150. B. R. Groveman, R. Walters i C. L. Haigh, Using our mini-brains: cerebral organoids as an improved cellular model for human prion disease, *Neural Regen. Res.* **15** (2020) 1019–

- 1020.
151. L. Muckova, J. Pejchal, P. Jost, N. Vanova, D. Herman i D. Jun, Cytotoxicity of acetylcholinesterase reactivators evaluated in vitro and its relation to their structure, *Drug Chem. Toxicol.* **42** (2019) 252–256.
152. M. Katalinić, A. Zandona, A. Ramić, T. Zorbaz, I. Primožič i Z. Kovarik, New Cinchona Oximes Evaluated as Reactivators of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Compounds, *Molecules* **22** (2017) 1234.
153. L. Muckova, N. Vanova, J. Misik, D. Herman, J. Pejchal i D. Jun, Oxidative stress induced by oxime reactivators of acetylcholinesterase *in vitro*, *Toxicol. Vitro.* **56** (2019) 110–117.
154. A. Prado, G. A. Petroianu, D. E. Lorke i J. W. Chambers, A trivalent approach for determining *in vitro* toxicology: Examination of oxime K027, *J. Appl. Toxicol.* **35** (2015) 219–227.
155. K. Kuca, J. Cabal, J. Kassa, D. Jun i M. Hrabínova, *In vitro* potency of H oximes (HI-6, HLö-7), the oxime BI-6, and currently used oximes (pralidoxime, obidoxime, trimedoxime) to reactivate nerve agent-inhibited rat brain acetylcholinesterase, *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* **69** (2006) 1431–1440.
156. A. Zandona, M. Katalinić, G. Šinko, A. Radman Kastelic, I. Primožič i Z. Kovarik, Targeting organophosphorus compounds poisoning by novel quinuclidine-3 oximes: development of butyrylcholinesterase-based bioscavengers, *Arch. Toxicol.* **94** (2020) 3157–3171.
157. G. Mercey, T. Verdelet, G. Saint-André, E. Gillon, A. Wagner, R. Baati, L. Jean, F. Nachon i P. Y. Renard, First efficient uncharged reactivators for the dephosphylation of poisoned human acetylcholinesterase, *Chem. Commun.* **47** (2011) 5295.
158. K. Dolinar, V. Jan, M. Pavlin, A. V. Chibalin i S. Pirkmajer, Nucleosides block AICAR-stimulated activation of AMPK in skeletal muscle and cancer cells, *Am J Physiol Cell Physiol* **315** (2018) C803–C817.
159. W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability, *Curr. Protoc. Immunol.* **111** (2015) A3.B.1-A3.B.3.
160. T. O'Brien, G. Babcock, J. Cornelius, M. Dingeldein, G. Talaska, D. Warshawsky i K. Mitchell, A comparison of apoptosis and necrosis induced by hepatotoxins in HepG2 cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **164** (2000) 280–290.

161. D. Wu i P. Yotnda, Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers, *J. Vis. Exp.* **2** (2011) 1–5.
162. A. Rastogi, C. W. Clark, S. M. Conlin, S. E. Brown i A. R. Timme-Laragy, Mapping glutathione utilization in the developing zebrafish (*Danio rerio*) embryo, *Redox Biol.* **26** (2019) 101235.
163. J. W. Polli, S. A. Wring, J. E. Humphreys, L. Huang, J. B. Morgan, L. O. Webster i C. S. Serabjit-Singh, Rational use of *in vitro* P-glycoprotein assays in drug discovery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299** (2001) 620–628.
164. J. Padovan, J. Ralić, V. Letfus, A. Milić i V. B. Mihaljevic, Investigating the barriers to bioavailability of macrolide antibiotics in the rat, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **37** (2012) 163–171.
165. H. Pajouhesh i G. R. Lenz, Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs, *NeuroRx* **2** (2005) 541–553.
166. A. Daina, O. Michielin i V. Zoete, SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* **7** (2017) 1–13.
167. C. Diefenbach, H. Mellinghoff, S. Grond i W. Buzello, Atracurium and vecuronium: Repeated bolus injection versus infusion, *Anesth. Analg.* **74** (1992) 519–522.
168. B. Wang, L. P. Yang, X. Z. Zhang, S. Q. Huang, M. Bartlam i S. F. Zhou, New insights into the structural features and functional relevance of human cytochrome P450 2C9. Part I, *Curr. Drug Metab.* **10** (2010) 1075–1126.
169. I. Fleming, The pharmacology of the cytochrome P450 epoxide/hydrolyase axis in the vasculature and cardiovascular disease, *Pharmacol. Rev.* **66** (2014) 1106–1140.
170. F. Walter, J. Pütz, R. Giegé i E. Westhof, Binding of tobramycin leads to conformational changes in yeast tRNA^{Asp} and inhibition of aminoacylation, *EMBO J.* **21** (2002) 760–768.
171. A. K. Ghosh i H. L. Osswald, BACE1 (β -secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 6765–6813.
172. I. Suzuki, M. Kondoh, F. Nagashima, M. Fujii, Y. Asakawa i Y. Watanabe, A comparison of apoptosis and necrosis induced by ent-kaurene-type diterpenoids in HL-60 cells, *Planta Med.* **70** (2004) 401–406.

173. M. Schieber i N. S. Chandel, ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Curr. Biol.* **24** (2014) R453–R462.
174. L. D. Zorova, V. A. Popkov, E. Y. Plotnikov, D. N. Silachev, I. B. Pevzner, S. S. Jankauskas, V. A. Babenko, S. D. Zorov, A. V. Balakireva, M. Juhaszova, S. J. Sollott i D. B. Zorov, Mitochondrial membrane potential, *Anal. Biochem.* **552** (2018) 50–59.
175. B. M. Leist, B. Single, A. F. Castoldi i S. Kühnle, Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis, *Toxicol. Lett.* **102** (1997) 1481–1486.
176. P. Li, L. Zhou, T. Zhao, X. Liu, P. Zhang, Y. Liu, X. Zheng i Q. Li, Caspase-9: Structure, mechanisms and clinical application, *Oncotarget* **8** (2017) 23996–24008.
177. B. Tummers i D. R. Green, Caspase-8: regulating life and death, *Immunol. Rev.* **277** (2017) 76–89.
178. M. Ibarguren, D. J. López i P. V. Escribá, The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838** (2014) 1518–1528.
179. S. Mukherjee, A. P. Bapat, M. R. Hill i B. S. Sumerlin, Oximes as reversible links in polymer chemistry: Dynamic macromolecular stars, *Polym. Chem.* **5** (2014) 6923–6931.
180. W. S. Choi, D. S. Eom, B. S. Han, W. K. Kim, B. H. Han, E. J. Choi, T. H. Oh, G. J. Markelonis, J. W. Cho i Y. J. Oh, Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8- and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 20451–20460.
181. C. P. Lim i X. Cao, Structure, function, and regulation of STAT proteins, *Mol. Biosyst.* **2** (2006) 536–550.
182. K. R. Lamontagne, J. Butler, V. B. Borowski, A. R. Fuentes-Pesquera, J. M. Blevitt, S. Huang, R. Li, P. J. Connolly i L. M. Greenberger, A highly selective, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor has potent activity *in vitro* and *in vivo*, *Angiogenesis* **12** (2009) 287–296.
183. H. Qiang, W. Gu, D. D. Huang, W. Shi, Q. Qiu, Y. Dai, W. Huang i H. Qian, Design, synthesis and biological evaluation of 4-aminopyrimidine-5-carbaldehyde oximes as dual inhibitors of c-Met and VEGFR-2, *Bioorganic Med. Chem.* **24** (2016) 3353–3358.
184. M. Zou, S. Xia, L. Zhuang, N. Han, Q. Chu, T. Chao, P. Peng, Y. Chen, Q. Gui i S. Yu,

- Knockdown of the Bcl-2 gene increases sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors in the H1975 lung cancer cell line harboring T790M mutation, *Int. J. Oncol.* **42** (2013) 2094–2102.
185. Y. Tsujimoto, Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?, *Genes to Cells* **3** (1998) 697–707.
186. J. Kalous, A. Tetkova, M. Kubelka i A. Susor, Importance of ERK1/2 in regulation of protein translation during oocyte meiosis, *Int. J. Mol. Sci.* **19** (2018) 1–21.
187. R. Roskoski, ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation, *Pharmacol. Res.* **66** (2012) 105–143.
188. S. J. Wakil i L. A. Abu-Elheiga, Fatty acid metabolism: Target for metabolic syndrome, *J. Lipid Res.* **50** (2009).
189. L. J. Mandel, Primary active sodium transport, oxygen consumption, and ATP: Coupling and regulation, *Kidney Int.* **29** (1986) 3–9.
190. L. R. Forrest, R. Krämer i C. Ziegler, The structural basis of secondary active transport mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807** (2011) 167–188.
191. M. K. Degorter, C. Q. Xia, J. J. Yang i R. B. Kim, Drug transporters in drug efficacy and toxicity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **52** (2012) 249–273.
192. B. OuYang, S. S. Pochapsky, M. Dang i T. C. Pochapsky, A functional proline switch in cytochrome P450cam, *Structure* **16** (2008) 916–923.
193. C. A. Hasemann, R. G. Kurumbail, S. S. Boddupalli, J. A. Peterson i J. Deisenhofer, Structure and function of cytochromes P450: A comparative analysis of three crystal structures, *Structure* **3** (1995) 41–62.
194. S. A. Marchitti, C. Brocker, D. Stagos i V. Vasiliou, Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: The aldehyde dehydrogenase superfamily, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4** (2008) 697–720.
195. J. P. Spence, T. Liang, C. J. P. Eriksson, R. E. Taylor, T. L. Wall, C. L. Ehlers i L. G. Carr, Evaluation of aldehyde dehydrogenase 1 promoter polymorphisms identified in human populations, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **27** (2003) 1389–1394.
196. C. N. Landen, B. Goodman, A. A. Katre, A. D. Steg, A. M. Nick, R. L. Stone, L. D. Miller, P. V. Mejia, N. B. Jennings, D. M. Gershenson, R. C. Bast, R. L. Coleman, G. Lopez-Berestein i A. K. Sood, Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in

- ovarian cancer, *Mol. Cancer Ther.* **9** (2010) 3186–3199.
197. X. F. Yao, J. Cao, L. M. Xu, X. C. Sun, J. Kang, G. Yang, L. P. Jiang, C. Y. Geng, C. Z. Gao, L. F. Zhong i Y. F. Ma, Perfluorooctane sulfonate blocked autophagy flux and induced lysosome membrane permeabilization in HepG2 cells, *Food Chem. Toxicol.* **67** (2014) 96–104.
198. O. Soukup, D. Jun, G. Tobin i K. Kuca, The summary on non-reactivation cholinergic properties of oxime reactivators: The interaction with muscarinic and nicotinic receptors, *Arch. Toxicol.* **87** (2013) 711–719.
199. O. Soukup, J. Krušek, M. Kaniaková, U. K. Kumar, M. Oz, D. Jun, J. Fusek, K. Kuča i G. Tobin, Oxime reactivators and their *in vivo* and *in vitro* effects on nicotinic receptors, *Physiol. Res.* **60** (2011) 679–686.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime i prezime	Antonio Zandona
Adresa	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Ksaverska cesta 2, pp 291, HR-10001 Zagreb, Hrvatska
Telefon/ E-mail	+385 1 4682 551 / azandona@imi.hr
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum i mjesto rođenja	9.2.1992. Pula, Hrvatska
Radno iskustvo	
Datum (od – do)	2016. →
Ustanova	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Odjel	Jedinica za biokemiju i organsku analitičku kemiju
Radno mjesto	asistent
Područje istraživanja	Utjecaj strukture oksimskih reaktivatora i potencijalnih lijekova na razini stanice, stanični mehanizmi toksičnosti, aktivacija i inhibicija signalnih putova
Školovanje	
Datum (od – do)	2017. →
Ustanova	Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Studij	Poslijediplomski doktorski studij kemije, smjer biokemija
Datum (od – do)	2014. – 2016.
Ustanova	Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Studij	Diplomski studij molekularne biotehnologije
Naslov diplomskog rada	Pojačana ekspresija odabranih gena i rezistencija kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na inhibitore rasta
Zvanje	magistar inženjer molekularne biotehnologije
Datum (od – do)	2010. – 2014.
Ustanova	Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Studij	Preddiplomski studij biotehnologije
Naslov završnog rada	Primjena ionskih kapljevina i eutektičnih otapala u lipazom kataliziranoj sintezi butil-acetata
Zvanje	sveučilišni prvostupnik inženjer biotehnologije
Osobne vještine	
Materinji jezik	Hrvatski
Drugi jezici	Engleski (B2), Njemački (A2), Talijanski (A1)
Tehničke kompetencije	MS Office, GraphPad Prism, ChemDrawBio, ChemAxon's Marvin, SnapGene
Članstva	Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju (član), Forum mladih HDBMB-a (član), Hrvatsko toksikološko društvo (član)
Publikacije	
Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima (10)	
Sažeci sa skupova u zbornicima i časopisima (23)	
Ostale vrste radova (7)	

Popis publikacija

1. Matošević, Ana; Radman Kastelic, Andreja; Mikelić, Ana; **Zandona, Antonio**; Katalinić, Maja; Primožič, Ines; Bosak, Anita; Hrenar, Tomica. Quinuclidine-Based Carbamates as Potential CNS Active Compounds. *Pharmaceutics*, **13** (2021); 3; 420, 15.
2. **Zandona, Antonio**; Katalinić, Maja; Šinko, Goran; Radman Kastelic, Andreja; Primožič, Ines; Kovarik, Zrinka. Targeting Organophosphorus Compounds Poisoning by Novel quinuclidine-3 Oximes: Development of Butyrylcholinesterase-Based Bioscavengers. *Archives of Toxicology*, **94** (2020), 9; 3157-3171.
3. Zorbaz, Tamara; Mišetić, Petra; Probst, Nicolas; Žunec, Suzana; **Zandona, Antonio**; Mendaš, Gordana; Micek, Vedran; Maček Hrvat, Nikolina; Katalinić, Maja; Braiki, Anissa et al. Pharmacokinetic evaluation of brain penetrating morpholine-3-hydroxy-2-pyridine oxime as an antidote for nerve agent poisoning. *ACS Chemical Neuroscience*, **11** (2020), 7; 1072-1084.
4. Klinčić, Darija; Herceg Romanić, Snježana; Katalinić, Maja; **Zandona, Antonio**; Čadež, Tena; Matek Sarić, Marijana; Šarić, Tomislav; Aćimov, Dejan. Persistent organic pollutants in tissues of farmed tuna from the Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **158** (2020), 111413, 7.
5. **Zandona, Antonio**; Lihtar, Gabriela; Maraković, Nikola; Miš, Katarina; Bušić, Valentina; Gašo- Sokač, Dajana; Pirkmajer, Segej; Katalinić, Maja. Vitamin B3-Based Biologically Active Compounds as Inhibitors of Human Cholinesterases. *International journal of molecular sciences*, **21** (2020), 21; 8088, 19.
6. **Zandona, Antonio**; Katalinić, Maja. Nicotinic acetylcholine receptors: Diversity and physiological importance for neurodegenerative disorders and development of organophosphate antidotes. *Periodicum biologorum*, **121-122** (2020), 3-4; 115-128
7. Štafa, Anamarija; Žunar, Bojan; Franklin, Andrea; **Zandona, Antonio**; Svetec Miklenić, Marina; Šantek, Božidar; Svetec, Ivan-Krešimir. Novel Approach in the Construction of Bioethanol- Producing *Saccharomyces cerevisiae* Hybrids. *Food Technology and Biotechnology*, **57** (2019), 1; 5-16.
8. Zorbaz, Tamara; Malinak, David; Maraković, Nikola; Maček Hrvat, Nikolina; **Zandona, Antonio**; Novotny, Michal; Skarka, Adam; Andrys, Rudolf; Benkova, Marketa; Soukup, Ondrej et al. Pyridinium oximes with ortho-positioned chlorine moiety exhibit improved physico- chemical properties and efficient reactivation of human acetylcholinesterase inhibited by several nerve agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **61** (2018), 23; 10753-10766.
9. Štafa, Anamarija; Svetec Miklenić, Marina; **Zandona, Antonio**; Žunar, Bojan; Čadež, Neža; Petković, Hrvoje; Svetec, Ivan Krešimir. In *Saccharomyces cerevisiae* gene targeting fidelity depends on a transformation method and proportion of the overall length of the transforming and targeted DNA. *FEMS Yeast Research*, **17** (2017), 4; fox041, 10.
10. Katalinić, Maja; **Zandona, Antonio**; Ramić, Alma; Zorbaz, Tamara; Primožič, Ines; Kovarik, Zrinka. New cinchona oximes evaluated as reactivators of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds. *Molecules*, **22** (2017), 1234-1241.

Nagrade i stipendije

1. Stipendija *Europske organizacije za molekularnu biologiju (EMBO) - Short Term Fellowship* (2020) za usavršavanje do 3 mjeseca na Institutu za molekularnu medicinu, Lisabon, Portugal
2. Nagrada za najbolji poster na *Simpoziju studenata doktorskih studija PMF-a* (2020), Zagreb, Hrvatska
3. Nagrada za poster na *Kongresu Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju - HDBMB* (2019), Lovran, Croatia
4. Druga nagrada za prezentaciju na *19th Young Scientists Forumu na 44th Federation of European Biochemical Societies* u okviru *Communication Challenge* (2019), Krakow, Poljska
5. Stipendija za sudjelovanje na *19th Young Scientists Forumu i 44th Federation of European Biochemical Societies* (2019), Krakow, Poljska
6. Stipendija za sudjelovanje na *13th International Meeting on Cholinesterases and the 7th International Conference on Paraoxonases* (2018), Hradec Králové, Češka