

Novi pristup analizi oksima dizajniranih za zaštitu središnjeg živčanog sustava pri trovanju organofosfornim spojevima

Zorbaz, Tamara

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:451370>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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





University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Tamara Zorbaz

**A NEW APPROACH TO THE ANALYSIS OF OXIMES
DESIGNED TO PROTECT CENTRAL NERVOUS
SYSTEM IN ORGANOPHOSPHORUS POISONING**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Tamara Zorbaz

**NOVI PRISTUP ANALIZI OKSIMA DIZAJNIRANIH ZA
ZAŠTITU SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA PRI
TROVANJU ORGANOFOSFORNIM SPOJEVIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:
dr. sc. Zrinka Kovarik, znan. savj. u tr. zv.

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Tamara Zorbaz

**A NEW APPROACH TO THE ANALYSIS OF OXIMES
DESIGNED TO PROTECT CENTRAL NERVOUS
SYSTEM IN ORGANOPHOSPHORUS POISONING**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr Zrinka Kovarik, Permanent Scientific Advisor

Zagreb, 2018

Od srca hvala mentorici dr. sc. Zrinki Kovarik na ukazanom povjerenju i brojnim pruženim prilikama za učenje i usavršavanje, kao i na prenesenom znanju i vodstvu tijekom izrade doktorske disertacije.

Hvala svim kolegama Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju, a posebno dr. sc. Maji Katalinić i Antoniu Zandoni na pomoći oko eksperimenata sa staničnim linijama, dr. sc. Nikoli Marakoviću na pomoći s molekulskim modeliranjem, i dr. sc. Goranu Šinku na stručnim savjetima.

Hvala dr. vet. Vedranu Miceku, dr. sc. Nikolini Maček Hrvat i dr. sc. Gordani Mendaš Starčević na pomoći u provođenju svih in vivo vezanih eksperimenata.

Hvala Petri Mišetić (Fidelta d.o.o., Zagreb, Hrvatska) i dr. sc. Vesni Gabelici Marković na eksperimentima kromatografskog određivanja lipofilnosti i metaboličke stabilnosti oksima.

Hvala suradnicima dr. sc. Pierre-Yvesu Renardu, dr. sc. Ludovicu Jeanu i dr. sc. Anissi Braïki (Normandie Université, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA, UMR 6014, Rouen, Francuska) na hidroksipiridinskim oksimima.

Hvala dr. sc. Kamilu Musileku (Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Králové, Hradec Králové, Češka Republika) na klorpiridinijevim oksimima.

Hvala dr. sc. Florianu Nachonu (Département de Toxicologie et Risques Chimiques, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge, Francuska) na uzorcima enzima korištenim u izradi ove disertacije.

Hvala Teni Čadež na informacijama iz vanjskog svijeta.

Hvala Hrvoju na velikoj podršci.

Veliko hvala roditeljima i sestri Dorotei koji su uvijek uz mene i koji su jednako zaslužni za sva moja postignuća.

Tamara Zorbaz

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	5
2.1. Organofosforni spojevi	5
2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva i kemijske reakcije OP spojeva	6
2.1.2. Mehanizam toksičnosti OP spojeva i klinička slika	9
2.2. Kolinesteraze kao glavna meta OP spojeva i terapije trovanja OP spojevima	14
2.2.1. Općenito o kolinesterazama.....	14
2.2.2. Katalitička aktivnost kolinesteraza i interakcije s ligandima	17
2.2.3. Inhibicija kolinesteraza OP spojevima i vezane reakcije.....	19
2.3. Razvoj oksimskih reaktivatora inhibiranih kolinesteraza i njihov farmakološki profil	22
2.3.1. Osnove farmakologije – farmakodinamika i farmakokinetika lijekova.....	23
2.3.2. Farmakološki profil oksima koji se koriste u medicinskoj praksi te njihovi nedostaci	25
2.4. Dizajn reaktivatora s djelovanjem u središnjem živčanom sustavu.....	27
2.4.1. Središnji živčani sustav	27
2.4.2. Pristupi u dizajnu lijekova s djelovanjem u središnjem živčanom sustavu	32
2.4.3. Novije generacije reaktivatora s djelovanjem u središnjem živčanom sustavu	35
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	41
3.1. Oksimi	41
3.2. Spektrofotometrijska i kinetička mjerenja.....	44
3.2.1. Kemikalije i enzimi.....	44
3.2.2. Određivanje pK_a vrijednosti oksimske skupine.....	45
3.2.3. Određivanje aktivnosti kolinesteraza metodom po Ellmanu.....	46
3.2.4. Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima.....	48
3.2.5. Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima	50
3.3. In silico metode.....	53
3.3.1. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava oksima	53
3.3.2. Molekulsko modeliranje oksima u 3D strukture kolinesteraza	53
3.4. Eksperimentalno određivanje lipofilnosti oksima.....	55
3.4.1. Kemikalije	55
3.4.2. Određivanje Chrom logD koeficijenta lipofilnosti oksima	55

3.5. Određivanje toksičnog učinka oksima na stanice	56
3.5.1. <i>Kemikalije, mediji i stanične linije.....</i>	56
3.5.2. <i>Određivanje citotoksičnosti oksima</i>	57
3.5.3. <i>Određivanje indukcije oksidacijskog stresa oksimima.....</i>	58
3.6. Metabolička stabilnost oksima <i>in vitro</i>	59
3.6.1. <i>Kemikalije i mikrosomi</i>	59
3.6.2. <i>Određivanje metaboličke razgradnje oksima uslijed inkubacije s mikrosomima</i>	60
3.7. Farmakokinetika oksima JR595 na modelu miša	61
3.7.1. <i>Kemikalije i životinje.....</i>	61
3.7.2. <i>Tretiranje miševa i priprema uzoraka.....</i>	62
3.7.3. <i>Određivanja koncentracije oksima JR595 u biološkim uzorcima</i>	63
§ 4. REZULTATI.....	65
4.1. Hidroksipiridinski oksimi.....	65
4.1.1. <i>Procjena nukleofilnog potencijala oksima prema pK_a oksimske skupine</i>	65
4.1.2. <i>Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima.....</i>	66
4.1.3. <i>Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima</i>	67
4.1.4. <i>Afinitet različitih konjugata enzima prema oksimima te molekulsko modeliranje.....</i>	72
4.1.5. <i>Fizikalno-kemijska svojstva oksima</i>	76
4.1.6. <i>Citotoksičnost oksima i indukcija oksidacijskog stresa u staničnim linijama.....</i>	79
4.1.7. <i>Metabolička stabilnost oksima uslijed inkubacije s mikrosomima</i>	81
4.1.8. <i>Koncentracije oksima JR595 u krvi i mozgu tretiranih miševa</i>	82
4.2. Klorpiridinijevi oksimi	84
4.2.1. <i>Procjena nukleofilnog potencijala prema pK_a oksimske skupine</i>	84
4.2.2. <i>Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima.....</i>	86
4.2.3. <i>Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima</i>	86
4.2.4. <i>Afinitet različitih konjugata enzima prema oksimima te molekulsko modeliranje.....</i>	92
4.2.5. <i>Fizikalno-kemijska svojstva oksima</i>	96
4.2.6. <i>Citotoksičnost oksima i indukcija oksidacijskog stresa u staničnim linijama.....</i>	98
§ 5. RASPRAVA	99
§ 6. ZAKLJUČAK	115
§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	117
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	121
§ 9. ŽIVOTOPIS	141



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

NOVI PRISTUP ANALIZI OKSIMA DIZAJNIRANIH ZA ZAŠTITU SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA PRI TROVANJU ORGANOFOSFORNIM SPOJEVIMA

Tamara Zorbaz

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

Toksični organofosfori spojevi inhibiraju acetilkolinesterazu (AChE; EC 3.1.1.7) u sinapsama perifernog i središnjeg živčanog sustava (SŽS) te uzrokuju smrt ili dugotrajne neurološke poremećaje. Današnja terapija jesu oksimski reaktivatori inhibirane AChE, ali oni ne postižu dovoljne koncentracije u SŽS-u. Učinkovitost novosintetiziranih hidroksipiridinskih i klorpiridinijevih oksima dizajniranih s ciljem prolaska u SŽS ispitana je detaljnim kinetičkim istraživanjima reaktivacije AChE i butirilkolinesteraze (EC 3.1.1.8) inhibirane sarinom, ciklosarinom, VX-om, tabunom i paraoksonom. Analize njihovih fizikalno-kemijskih svojstava bitnih za prolazak u SŽS, *in vitro* toksičnosti, metaboličke stabilnosti i farmakokinetičkog profila na modelu miša, poslužile su za racionalan odabir vodećeg oksima za daljnja istraživanja, oksima 2-[(hidroksiimino)metil]-6-[4-(morfolin-4-il)butil]piridin-3-ola, koji ima potencijal reaktivirati AChE u perifernim tkivima i mozgu. Ovaj pristup analizi omogućio je bolji probir vodećih reaktivatora od uobičajene analize bazirane na reaktivacijskoj učinkovitosti oksima. Stoga se preporuča da ovakva evaluacija reaktivatora prethodi *in vivo* antidotskim testiranjima u smislu uvažavanja općeprihvaćenih pravila za zaštitu životinja.

(XX + 142 stranica, 53 slike, 40 tablica, 207 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: antidot / farmakokinetika / kolinesteraze / krvno-moždana barijera / pesticidi / reaktivacija / živčani bojni otrovi

Mentor: dr. sc. Zrinka Kovarik, znan. savj. u tr. zv.

Rad prihvaćen: 10. listopada 2018.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Ines Primožič
2. dr. sc. Maja Katalinić, v. zn. sur.
3. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zamjena: prof. dr. sc. Jerka Dumić



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

A NEW APPROACH TO THE ANALYSIS OF OXIMES DESIGNED TO PROTECT CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN ORGANOPHOSPHORUS POISONING

Tamara Zorbaz

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

Toxic organophosphorus compounds inhibit acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) in the synapses of the peripheral and central nervous system (CNS) and cause death or long-term neurological impairments. Therapy includes oxime reactivators of the inhibited AChE, but they do not achieve sufficient concentrations in the CNS. The efficiency of newly-synthesized hydroxyl-pyridine and chloro-pyridinium oximes, designed with an aim to cross into the CNS, was evaluated here with a detailed kinetic investigation of the reactivation of AChE and butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) inhibited by sarin, cyclosarin, VX, tabun and paraoxon. Analyses of physicochemical properties important for crossing into the CNS, *in vitro* toxicity, metabolic stability and pharmacokinetic profile in mouse model, were used for the rational determination of the lead oxime for further tests, 2-((hydroxyimino)methyl)-6-(4-(morpholin-4-yl)butyl)pyridin-3-ol oxime, that has potency to reactivate AChE in peripheral tissues and the brain. This approach enabled better screening for lead compounds in comparison to the standard analysis based on the reactivation efficiency of the oximes. Therefore, this kind of reactivator evaluation is recommended before *in vivo* antidotal testing, as it would significantly improve adherence to rules for animal welfare.

(XX + 142 pages, 53 figures, 40 tables, 207 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: antidote / blood-brain barrier / cholinesterases / pesticides / pharmacokinetics / reactivation / nerve agents

Supervisor: Dr. Zrinka Kovarik, Permanent Scientific Advisor

Thesis accepted: 10 October 2018

Reviewers :

1. Dr. Ines Primožič, Associate Professor
2. Dr. Maja Katalinić, Senior Scientific Associate
3. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

Substitute: Dr. Jerka Dumić, Professor

§ 1. UVOD

Trovanje smrtonosnim organofosforim spojevima (OP) je aktualan problem, obzirom da je učestalost slučajnog ili namjernog trovanja OP spojevima koji se koriste kao pesticidi oko tri milijuna godišnje na svjetskoj razini.^{1,2} Osim toga, OP živčani bojni otrovi, iako zabranjeni Konvencijom o kemijskom oružju iz 1997. godine, upotrijebljeni su u terorističkim napadima u Siriji, Maleziji i Velikoj Britaniji u posljednje dvije godine.³⁻⁶ Mehanizam toksičnog djelovanja OP spojeva je ireverzibilna inhibicija acetilkolinesteraze (AChE; EC 3.1.1.7), esencijalnog enzima u sinapsama perifernog i središnjeg živčanog sustava (SŽS). AChE katalizira hidrolizu neurotransmitera acetilkolina (ACh) i time ostvaruje bitnu ulogu u kontroli prijenosa kolinergičnog živčanog impulsa. Usljed inhibicije aktivnosti AChE OP spojem, dolazi do nakupljanja ACh u sinaptičkoj pukotini i prekomjerne stimulacije nikotinskih i muskarinskih acetilkolininskih receptora (nAChR i mAChR).⁷ Skup simptoma trovanja, koji se pritom javljaju, naziva se kolinergičnom krizom i uključuje poremećaje vida, tremore, pojačanu salivaciju, a u težim slučajevima dolazi do napadaja, zatajenja disanja i smrti. Srodni enzim butirilkolinesteraza (BChE; EC 3.1.1.8), čija fiziološka uloga nije poznata i koji se većinom nalazi u plazmi, kovalentnim vezanjem OP spojeva može smanjiti dostupnu koncentraciju OP spoja koja inhibira AChE u sinapsama.⁸⁻¹⁰

Također, preživjeli mogu imati dugotrajne posljedice zbog oštećenja živčanih stanica u specifičnim regijama mozga zaduženim za kognitivne i bihevioralne sposobnosti (pr. hipokampus, centralni korteks).^{11,12} Navedeni poremećaji su uočeni kod ljudi koji su preživjeli terorističke napade OP spojevima u Japanu (1994. u Matsumotu i 1995. u Tokiju).¹³ Neurološka oštećenja obuhvaćaju različite promjene i poremećaje, ne samo u kolinergičnom sustavu, već i u sustavima ostalih neurotransmitera (pr. prekomjerna aktivnost ekscitacijskog glutamatnog sustava; deaktivacija inhibicijskog sustava γ -aminomaslačne kiseline, GABA)^{7,14-18} koji mogu biti uzrokovani indirektno inhibicijom AChE ili direktno interakcijom OP spojeva s drugim makromolekulama. Pokazano je i da OP spojevi mogu direktno reagirati s nAChR i mAChR receptorima te glutamatnim receptorima u SŽS-u.^{14,15,19-21} Dodatno, istraživanja su pokazala da prekomjerna stimulacija mAChR dugotrajno povećanom koncentracijom ACh u SŽS-u uzrokuje smanjenje ekspresije ovog receptora, dovodi do njegove desenzitizacije (tj. smanjen odgovor receptora na ACh) i internalizacije (tj. endocitoza receptora) u hipokampusu, što može

biti jednim od mogućih uzroka dugotrajnih poremećaja kognitivnih funkcija nakon trovanja OP spojevima.^{12,22,23} Također, vidljive su i različite promjene na staničnoj razini poput povećanja unutarstaničnog kalcija,⁷ povećanja koncentracije proupalnih čimbenika i proapoptoznih signalnih molekula te povećano stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS; engl. *reactive oxygen species*).²⁴ Ovi poremećaji mogu dovesti do propadanja neurona te dugotrajnih neuroloških posljedica.²⁵

Farmakološka terapija trovanja OP spojevima, koja se primjenjuje u medicinskoj praksi, sastoji se od tri lijeka drugačijeg djelovanja: antagonista mAChR receptora (npr. atropin) koji smanjuje muskarinske simptome, agonista GABA-A receptora (npr. diazepam ili njegov prolijek avizafon) koji aktivira GABA neurotransmiterski sustav i inhibira živčani prijenos te djeluje kao antikonvulziv, i najbitnije, nukleofilnog spoj iz klase oksima koji djeluje kao reaktivator AChE inhibirane OP spojem. Reaktivacija je proces u kojem anion oksimske skupine (oksimat) djeluje kao nukleofil u supstituciji elektrofilnog OP ostataka vezanog za serin, pa nukleofilni potencijal donekle ovisi o kiselobaznoj konstanti disocijacije oksimske skupine te je poželjno da pK_a vrijednost te skupine bude između 7,3 i 8,0.²⁶ Učinkovitost reaktivacije ovisi i o afinitetu inhibiranog enzima prema oksimu koji je rezultat položaja oksima i nekovalentnih interakcija koje on ostvaruje s aminokiselinama aktivnog ždrijela enzima. Dakako, učinkovitost pojedinog oksima za reaktivaciju pojedinih OP-AChE konjugata posljedica je njihovih različitih steričkih i elektronskih karakteristika, točnije karakteristika OP spoja vezanog na katalitički centar – serin. Nijedan od oksima korištenih u medicinskoj praksi (tzv. standardni oksimi), u koje ubrajamo 2-PAM, HI-6 i obidoksim te TMB-4, nije jednako učinkovit za sve OP spojeve. K tome, standardni oksimi svoje djelovanje uglavnom pokazuju u sinapsama perifernog živčanog sustava, jer u mozgu postižu relativno male koncentracije koje iznose maksimalno 10 % one koncentracije koja je ostvarena u krvi.^{27–32} Razlog slabog prolaska ovih oksima u SŽS jest postojanje kvaternog dušikovog atoma u sklopu jednog ili dva piridinijeva prstena u strukturi (tzv. kvaterni mono- ili bispiridinijevi oksimi). Pozitivni naboj molekule otežava i usporava pasivni transport oksima kroz krvno-moždanu barijeru (KMB), odnosno barijere između periferije i SŽS-a koja štiti mozak od djelovanja različitih endogenih i egzogenih molekula. Osim toga, pozitivno nabijeni piridinijevi oksimi imaju međusobno slične farmakokinetičke karakteristike, tj. brzo se apsorbiraju u krvotok nakon intramuskularne primjene zbog čega je njihova biodostupnost dobra. Međutim, oni se i brzo eliminiraju putem

bubrega, uglavnom ishodni nemetabolizirani spoj,³³⁻³⁶ a to zahtjeva opetovanu administraciju u primjeni terapije.

Zbog nedostataka postojeće terapije, potraga za učinkovitijim reaktivatorom, a u zadnje vrijeme i reaktivatorom koji pokazuje svoje djelovanje i u SŽS-u, dovela je do sinteze i dizajna brojnih novih oksimskih i neoksimskih³⁷ reaktivatora. Najvažniji pomaci u dizajnu učinkovitijih reaktivatora od onih koji se danas koriste, uključuju nove generacije reaktivatora različitih osnovnih struktura bez kvaternog dušika koji bi prolazili kroz KMB-u³⁸⁻⁴⁷ te kvaternih oksima kojima je povećana lipofilnost fluorinacijom⁴⁸⁻⁵⁰ ili povezivanjem piridinijevog prstena s lipofilnim supstituentima.⁵¹

Svrha ove disertacije bila je ispitati terapijski potencijal dviju novih skupina oksimskih reaktivatora dizajniranih s ciljem povećanja prolaska kroz KMB-u pasivnim transportom i reaktivacije AChE u sinapsama mozga. Prva skupina novih reaktivatora jesu hidropiridinski oksimi s tercijarnim dušikom unutar piridinskog prstena. Oni su dizajnirani iz dva funkcionalno različita dijela: piridinskog prstena s oksimskom skupinom koja služi za reaktivaciju inhibiranog enzima te aromatskog sustava za ostvarivanje π - π ili kation- π interakcija oksima s perifernim anionskim mjestom AChE čime se povećava afinitet enzima prema oksimu. Poveznicu između dva dijela čini lanac od četiri ili pet ugljikovih atoma. Drugu skupinu oksima predstavljaju klorpiridinijevi oksimi koji su dizajnirani s ciljem povećanja nukleofilnog potencijala oksimske skupine i lipofilnosti molekule dodavanjem atoma klora na piridinijev prsten piridinijevih oksima koji su se već prije pokazali učinkovitim reaktivatorima AChE inhibirane OP spojevima (tzv. K-oksimi).⁵²⁻⁵⁹

Cilj ovog rada bio je primjenom novog pristupa analizi oksima, tj. raščlanjivanjem karakteristika koje ukazuju na njihova farmakološka svojstva, utvrditi imaju li navedene nove skupine oksima potencijal i prednost u terapiji trovanja OP spojevima pred standardnim oksimima te u ranoj fazi evaluacije uočiti njihove eventualne nedostatke koji bi onemogućili njihovo terapijsko (antidotsko) djelovanje *in vivo*. Ukoliko novosintetizirani oksimi pokažu učinkovitost u reaktivaciji inhibiranog enzima usporedivu ili bolju od standardnih oksima, hipoteza je bila da će dodatna istraživanja obuhvaćena ovim radom pomoći u utvrđivanju racionalnosti daljnjeg razvoja ovih skupina oksima kao potencijalnih antidota za slučajeve trovanja OP spojevima.

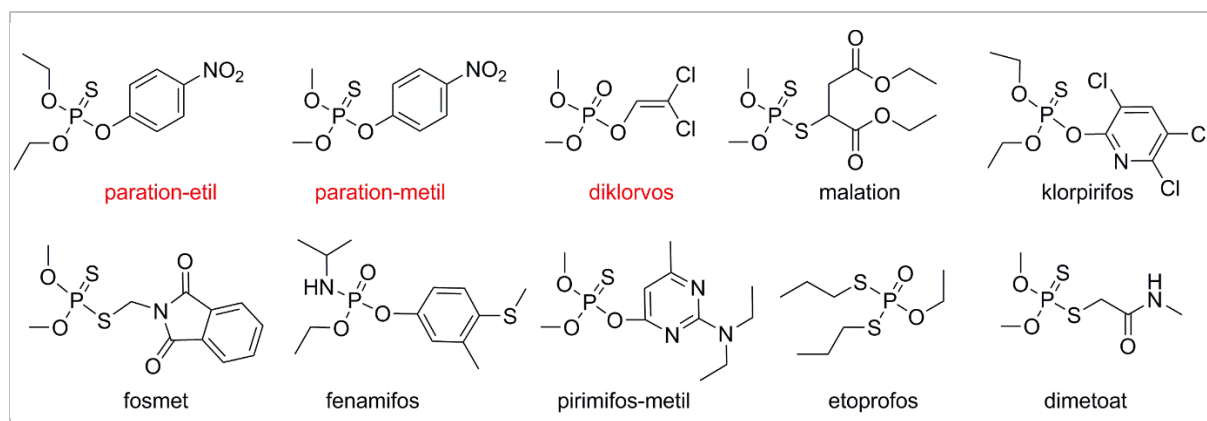
Kako bi se ispitaio ukupni terapijski potencijal ovih dviju skupina oksima, odredio se afinitet neinhibirane AChE i BChE prema oksimima, kao i afinitet enzima inhibiranih sarinom, ciklosarinom, VX-om, tabunom i metabolitom jednog od najtoksičnijeg pesticida, paraoksonom. Detaljnom analizom kinetike reaktivacije inhibiranih enzima s oksimima evaluirane su konstante brzine reaktivacije te je određena učinkovitost oksima u reaktivaciji različitih konjugata enzima i OP spoja. Koristeći pet različitih OP spojeva procijenjena je univerzalnost oksima, odnosno njegova djelotvornost u reaktivaciji različitih konjugata fosfiliranih enzima. Molekulskim modeliranjem odredile su se karakteristike oksima važne za njihovo smještanje u aktivno ždrijelo enzima te su se pretpostavile interakcije koje oksim pritom ostvaruje s aminokiselinskim pobočnim lancima enzima. Eksperimentalno se odredila kiselo-bazne konstanta disocijacije, odnosno pK_a vrijednost, oksimske skupine kako bi se procijenila nukleofilnost oksima. Nadalje, vjerojatnost prolaska oksima kroz KMB-u procijenjena je evaluacijom njegovih fizikalno-kemijskih svojstava važnih za prolazak kroz fosfolipidni dvosloj (veličina, polarnost, fleksibilnost i ionizacijsko stanje oksima pri fiziološkom pH 7,4). Također, kromatografskom metodom odredio se koeficijent lipofilnosti Chrom $\log D$ pri pH 7,4. Ispitana je i metabolička stabilnost lipofilnih oksima *in vitro*, odnosno metabolizam enzimskim sustavom citokroma P450 (CYP450). S obzirom da lipofilnost molekule korelira s njenom akumulacijom i vezanjem na proteine, zbog čega je moguća pojava neželjenih učinaka u ciljnim i ostalim stanicama, ispitana je citotoksičnost odabranih oksima za stanice SŽS-a, hepatocita i nefrocita, a dodatno i mogućnost oksima da inducira oksidacijski stres u stanicama SŽS-a. Temeljem rezultata navedenih ispitivanja, odabran je jedan reprezentativni oksim čiji je prolazak kroz KMB-u ispitan *in vivo* na modelu CD-1 miša nakon intramuskularne (*i.m.*) primjene.

Očekuje se da će ova sveobuhvatna *in silico*, *in vitro* i *in vivo* analiza povezanosti strukture i aktivnosti u reaktivaciji te ostalih svojstava ispitivanih oksima usmjeriti daljnji razvoj i istraživanja oksima dizajniranih za prolazak kroz KMB-u i djelovanje u SŽS-u.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Organofosforni spojevi

Organofosforni (OP) spojevi su se u 20. stoljeću počeli koristiti kao pesticidi zbog visoke akutne toksičnosti i činjenice da se u okolišu razgrađuju brže od organoklornih pesticida.⁶⁰ Međutim, pokazano je da toksičan učinak OP spojeva nije selektivan prema vrstama zbog čega, osim suzbijanja biljnih nametnika, dolazi i do trovanja ljudi. Incidencija slučajnog ili namjernog trovanja ljudi OP pesticidima je oko tri milijuna godišnje na svjetskoj razini, od čega 200 000 slučajeva (7 %) završava smrću.^{1,2,61} Većina tih smrtnih slučajeva je zabilježeno u zemljama u razvoju, gdje korištenje pesticida nije pod strogom kontrolom, a medicinska skrb je slaba. Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije na popisu iznimno opasnih do onih manje opasnih pesticida nalazi se više od 60 OP pesticida,⁶² od kojih je čak njih šest dozvoljeno za upotrebu prema podatkovnoj bazi europske komisije.⁶³ Neki primjeri OP pesticida prikazani su na **slici 2.1**.



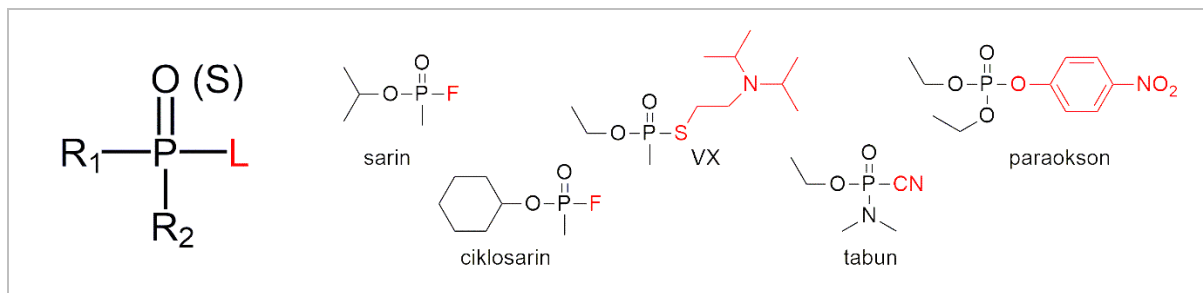
Slika 2.1. Primjeri organofosfornih pesticida. Crveno označeni pesticidi su zabranjeni za korištenje.⁶²

Tridesetih godina 20. stoljeća u laboratoriju Gerharda Schradera u Njemačkoj (tvornica IG Farben) započeo je razvoj OP spojeva, a zbog toksičnog djelovanja OP spojeva na ljude to je bio i početak razvoja živčanih bojnih otrova (engl. *nerve agents*). U Njemačkoj su razvijeni živčani bojni otrovi G-tipa (prema engl. *German*): tabun (GA; 1936.), sarin (GB; 1937.), soman (GD; 1944.) te ciklosarin (GF; 1949.), ali i visoko toksičan insekticid paration.^{15,60,64} Nešto kasnije, tijekom 1950-ih, u Velikoj Britaniji se sintetiziraju pesticid DFP te VX agensi (1952.), koji se pokazao potentnijim agensom od onih G-tipa. Razvoj bojnih otrova V-tipa

(prema engl. *Venom*, ali i *Victory* ili *Viscous*) nastavlja se tijekom Hladnog rata, primarno u Njemačkoj, Velikoj Britaniji, Sovjetskom Savezu, Kini te SAD-u.^{15,23,64} Unatoč postojanju Konvencije o kemijskom oružju (engl. *Chemical Weapon Convention*, CWC; 24. travnja 1997. je stupila na snagu) koja zabranjuje razvoj, proizvodnju, stvaranje zaliha i korištenje kemijskog oružja te kojom je određeno uništenje postojećih zaliha,⁶⁵ korištenje OP spojeva u vojne i terorističke svrhe zabilježeno je u Japanu (1994. u Matsumotu i 1995. u Tokiju)¹³ te nedavno u Siriji (2013. i 2017.; sarin)^{3,4} i u atentatu u Maleziji (2017.; VX).⁵ Do rujna 2015. Konvenciju su potpisale i ratificirale 192 države (Izrael još nije ratificirao, dok Egipat, Sjeverna Koreja i Južni Sudan još nisu potpisale Konvenciju). Zabrana se odnosi na različite skupine kemijskog oružja i njihovih prekursora, te se svaka upotreba u dozvoljene svrhe (npr. istraživačke) strogo regulira. Organizacija za zabranu kemijskog oružja (OPCW) je vrlo uspješno provodila i kontrolirala uništenje 99 % deklariranih živčanih bojnih otrova do travnja 2017. godine. Dodatno, i ove godine je velika pozornost javnosti bila usmjerena na atentat u Velikoj Britaniji (lipanj 2018.), u kojem se prema nekim sumnjama i navodima upotrijebio tip živčanog bojnog otrova iz kategorije tzv. *novichocka* (engl. *newcomer*) sintetiziranih u Sovjetskom Savezu tijekom 80-ih godina prošlog stoljeća.⁶ Osim kao pesticidi i živčani bojni otrovi, OP spojevi se koriste i u industriji, kao dodaci mazivima i uljima za motore.

2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva i kemijske reakcije OP spojeva

Po kemijskoj strukturi OP spojevi su esteri, anhidridi ili halogenidi dobiveni potpunom supstitucijom fosforne (H_3PO_4), fosfonske (H_3PO_3) i fosfinske kiseline (H_3PO_2), a njihovi se derivati nazivaju fosfatima, fosfonatima, odnosno fosfinatima ili se naziv odgovarajuće modificira ovisno o određenim supstituentima poput sumpora, dušika (pr. fosforotioat, fosfonotioat, fosforoditioat, fosforotritioat; fosforoamidati; fosforoamidotioati) ili fluora (fosforofluoridati, fosfonofluoridati).⁶⁴ Osnovu OP spoja čini peterovalentni fosfor s kovalentno vezanim kisikom ili sumporom te dva različita supstituenta R_1 i R_2 (alkil-, aril-, alkoksi-, alkiltio-, ariloksi-, mono- ili dialkil-amino) i izlaznom skupinom L (-F kod sarina, ciklosarina i somana; -CN kod tabuna; -SR₃ kod VX, VR, i CVX i malationa; -OR₃ najčešće kod pesticida, pr. paration). Osnovna struktura i primjeri najčešćih OP spojeva prikazane su na **slici 2.2**.



Slika 2.2. Opća formula organofosforne spojeva i formule živčanih bojnih otrova sarina, ciklosarina, VX-a, tabuna te metabolita pesticida parationa, paraoksona. Izlazne skupine označene su crvenom bojom.

OP spojevi su u čistom stanju, uz neka sitna odstupanja navedena u **tablici 2.1**, tekućine bez boje i mirisa što otežava uočavanje potencijalne opasnosti od trovanja prije nego li osoba bude izložena toksičnoj dozi spoja. Općenito, različita fizikalno-kemijska svojstva OP spojeva (**tablica 2.1**) bitno utječu i na neke razlike u njihovom cjelokupnom toksičnom potencijalu, koji ovisi o putu unosa u organizam, apsorpciji, distribuciji i eliminaciji u/iz organizma.

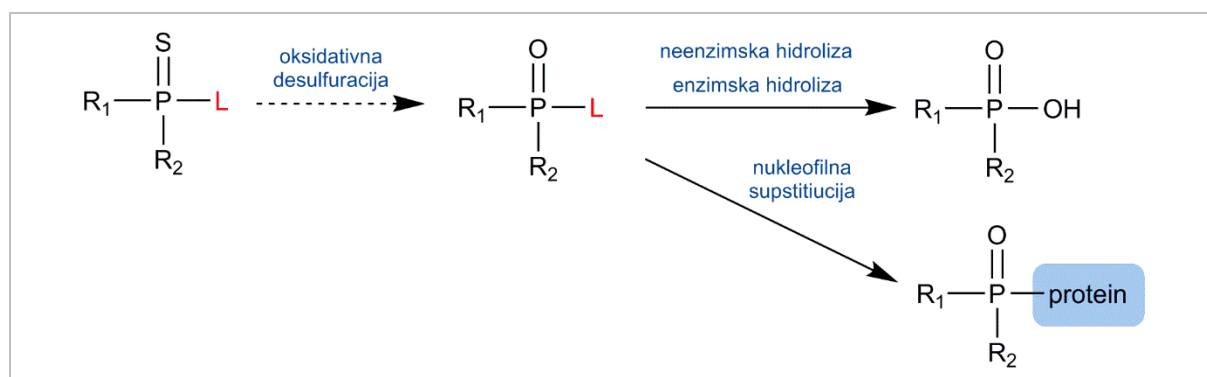
Tablica 2.1. Olfaktorna i neka bitnija fizikalno-kemijska svojstva organofosforne spojeva: molarna masa M , vrelište T_v , tlak para p , topljivost u vodi S , poluvrijeme hidrolize $t_{1/2}$, te koeficijent lipofilnosti $\log P$.^a

OP spoj	Olfaktorna svojstva	$M / \text{g mol}^{-1}$	$T_v / ^\circ\text{C}$	p / mbar	$S / \text{g dm}^{-3}$	$t_{1/2} / \text{h}$	$\log P$
Sarin	bezbojan, bez mirisa	140,1	158	2,8 (20°C)	Miješa se	39 (pH 7,0)	0,30 ^b
Ciklosarin	bezbojan	180,2	239	$5,9 \cdot 10^{-2}$ (25°C)	3,7 (20°C)	/	1,04 ^b
VX	žućkasto obojena tekućina bez mirisa	267,4	298	$9 \cdot 10^{-4}$ (20°C)	30 (20°C)	1000 (pH 7,0)	0,68 ^b
Tabun	bezbojna do smečkasta tekućina	162,1	240	$4,9 \cdot 10^{-2}$ (20°C)	98 (25°C)	8,5 (pH 7,0)	0,38 ^b
Soman	slab voćni miris	182,2	190	0,5 (25°C)	21 (20°C)	45 (pH 6,6)	1,82 ^b
Paration^c	žuto-smeđa tekućina s mirisom češnjaka	291,3	375	$5,3 \cdot 10^{-5}$ (20°C)	0,02 (25°C)	2594 (pH 7,4, 20°C) ^d	3,8
Paraokson^e	crvenkasto-žuta uljasta tekućina, slab voćni miris	275,2	169	$1,5 \cdot 10^{-6}$ (25°C)	0,004 (20°C)	3450 (pH 7,4, 20°C) ^d	1,98

^aPodaci iz ref. 66 i 67; ^bPodaci iz ref. 68; ^cParation-etil, podaci iz ref. 69; ^dPodaci iz ref. 70; ^eParaokson-etil, podaci iz ref. 71.

Živčani bojni otrovi se, ovisno o vanjskim uvjetima, nalaze u plinovitom ili tekućem stanju što omogućava da se rasprše u aerosolu. Tlak para određuje njihovu hlapljivost, te su živčani bojni otrovi G-tipa izuzetno hlapljivi (sarin > soman > ciklosarin > tabun), dok je VX oko 2000 puta manje hlapljiv od sarina.⁶⁷ Za hlapljive OP spojeve, inhalacija je najvjerojatniji način trovanja. S druge strane, razlike u lipofilnom karakteru (VX > soman > ciklosarin > tabun > sarin) uvjetuju da se VX kao najlipofilniji živčani bojni otrov značajno apsorbira putem kože te da se akumulira u koži i tkivima, odakle se postupno otpušta u krvotok.⁶⁷ Sarin se, dodatno, dobro miješa s vodom i ima najslabiji lipofilni karakter, što čini njegovu distribuciju u organizmu drugačijom od distribucije VX-a. Navedene karakteristike OP spojeva uvjetuju kraće

poluvrijeme života primjerice sarina i ciklosarina u organizmu u odnosu na poluvrijeme života VX-a koji se smatra perzistentnim spojem.⁷² OP pesticid paration, ishodni spoj paraoksiona, se pri 25 °C nalazi u plinovitom stanju i u obliku aerosola. Najveću opasnost od trovanja OP pesticidima imaju poljoprivredni radnici koji su izloženi parama pesticida prilikom raspršivanja, a zbog lipofilnosti se mogu apsorbirati i putem kože. Međutim, danas je najveći broj akutnih trovanja pesticidima posljedica namjernog trovanja ingestijom.¹



Slika 2.3. Organofosforni spojevi s kovalentno vezanim kisikom imaju toksičan potencijal zbog elektrofilnih svojstava, a gube ga hidrolizom veze između atoma fosfora i izlazne skupine L.

Nadalje, dvije značajne reakcije u koje ulaze OP spojevi koji imaju kisik vezan dvostrukom vezom su hidroliza i nukleofilna supstitucija (**slika 2.3**). Hidroliza veze između atoma fosfora i izlazne skupine, čime se gubi toksičan potencijal OP spoja, se odvija neenzimski u vodenom mediju (poluvrijeme hidrolize prikazano u **tablici 2.1**), a ubrzava se pri jako kiselom ili bazičnom pH.^{66,67} Bitno je istaknuti da je pri neutralnom pH brzina hidrolize VX-a bitno niža (20 – 120 puta) u odnosu na ostale živčane bojne otrove. Također, hidroliza parationa/paraoksiona je izuzetno spora pri neutralnom pH ($t_{1/2}$ ~100 dana), ali se pri bazičnom pH značajno ubrza (pr. pri pH 10,4 je poluvrijeme hidrolize parationa 33,2 h, a paraoksiona 6,0 h).⁷⁰ Osim spontane neenzimske hidrolize, hidroliza OP spojeva može biti katalizirana enzimima poput hidrolaze fosfornih triestera (PTH; EC 3.1.8) u koje spadaju paraoksonaze (PON1; EC 3.1.8.1) te diizopropil-fluorofosfataza (DFPaza; EC 3.1.8.2);). Osim njih, hidroliznu aktivnost prema OP spojevima pokazuje još nekoliko proteina: SMP30 (engl. *senescence marker protein-30*; EC 3.1.1.17), prolidaza (EC 3.4.13.9) te albumin.⁶⁷ U organizmu je reakcija hidrolize bitna kao mogući put detoksifikacije te je spoj koji pritom nastaje topljiv u vodi i brže se eliminira iz organizma. Toksičan učinak OP spojeva u organizmu proizlazi iz njihovog elektrofilnog karaktera zbog čega dolazi do nukleofilne supstitucije između OP spoja i određenih bočnih ogranaka aminokiselina pojedinih proteina, enzima ili receptora, što utječe

na fiziološko djelovanje tih proteina. Od enzima koje OP spojevi inhibiraju su najbitnije serinske hidrolaze kod kojih dolazi do nukleofilne supstitucije između OP spoja i serina u aktivnom mjestu enzima. Neke od najvažnijih serinskih hidrolaza su acetilkolinesteraza (AChE; EC 3.1.1.7), butirilkolinesteraza (BChE; EC 3.1.1.8) karboksilesteraza (CarbE; EC 3.1.1.1) te esteraza povezana s neuropatskim djelovanjem OP spojeva (NTE, od engl. *neuropathy-target esterase*, EC 3.1.1.5). Ostali proteini s kojima OP spojevi stvaraju adukte nukleofilnom supstitucijom na tirozinu, serinu ili lizinu jesu albumin i keratin, te ubikvitin i neki receptori (npr. acetilkolininski receptori).⁶⁷ Bitno je spomenuti da enzimi poput AChE, BChE i PON1 pokazuju svojstvo enantioselektivnosti prilikom reakcije s živčanim bojnim otrovima zbog čega postoji razlika u toksičnosti pojedinih stereoisomera OP spoja.^{67,73} Naime, svaki živčani bojni otrov ima dva stereoisomera zbog kiralnosti središnjeg atom fosfora, osim somana koji, zbog postojanja dodatnog kiralnog centra (ugljik), ima četiri diastereoisomera. Paraokson (paration), za razliku od živčanih bojnih otrova, nema kiralno središte.

2.1.2. Mehanizam toksičnosti OP spojeva i klinička slika

Kako je spomenuto, toksičan učinak OP spojeva rezultat je njihovog stvaranja adukata s različitim proteinima u organizmu, ali primarni mehanizam akutne toksičnosti OP spojeva je vezanje za AChE enzim i inhibicija njegove aktivnosti.⁷⁴ Letalna doza pojedinog OP spoja, tj. doza koja usmrti 50 % ispitivane populacije (LD₅₀), je prikazana u **tablici 2.2**.

Tablica 2.2. Letalne doze organofosfornih spojeva ovisno o putu primjene i vrsti organizma. ^a

OP spoj	Čovjek	Štakor	Miš	Zamorac	Zec
Inhalacija, LD₅₀ (mg min m⁻³)^b					
Sarin	50-100	80-300	240-380	100-200	75-144
VX	5-15	12 ^a	22 ^a	8,4 ^a	14-66 ^a
Tabun	150 ^b	30,4	0,5	197	84
Soman	70 ^b	70-165 ^a	33,3	24 ^a	20 ^a
Paration	/	/	/	/	/
Paraokson	/	230 ^{a,c}	270 ^{a,c} / 864 ^{a,d}	/	230 ^{a,c}
Perkutana primjena, LD₅₀ (μg kg⁻¹)					
Sarin	24 000-28 000	2500	1080	8750	925
VX	86 ^b	85 ^e	/	34	/
Tabun	14 000-21000	18 000	1000	25 840	2500
Soman	18 000 ^b	9830 ^e	7800	9930	/
Paration	/	6800	19 000	600 000	40 000
Paraokson	/	20 000 ^e	/	/	/
Ingestija, LD₅₀ (μg kg⁻¹)					
Paration	3000	2000	5000	/	/
Paraokson	/	1800 ^c	760 ^c	/	/

^aPotkožna primjena (s.c. od lat. *sub cutis*), često se koristi kao zamjena za unos inhalacijom, a doza se izražava u μg kg⁻¹. Podaci iz ref. 67; ^bMinimalna količina spoja koja se pokazala letalnom; ^cPodaci iz ref. 71; ^dPodaci iz ref. 75; ^ePodaci iz ref. 76.

Toksični potencijal živčanih bojnih otrova za čovjeka kreće se redom VX > sarin ~ soman > tabun za unos inhalacijom, tj. redom VX > soman ~ tabun > sarin za unos putem kože. Podaci o letalnim dozama parationa za čovjeka nisu dostupni, ali je zabilježena smrt kod ingestije tek 120 – 900 mg parationa, dok je s druge strane zabilježeno preživljenje u tri slučaja kada je ingestirano oko 20 – 40 g parationa.⁷⁷ Vežanje OP spojeva za ostale proteine poput BChE i CarbE može se smatrati jednim oblikom detoksifikacije u organizmu,^{78,79} jer se time umanjuje koncentracija slobodnog OP spoja koji je dostupan za inhibiciju AChE. Enzim CarbE povećano je eksprimiran u koži štakora i miševa, te zamoraca i zečeva kada se uspoređi s ekspresijom u koži primata, pa je toksičan učinak OP spojeva unesenih putem kože drugačiji između navedenih vrsta organizama.^{67,79}

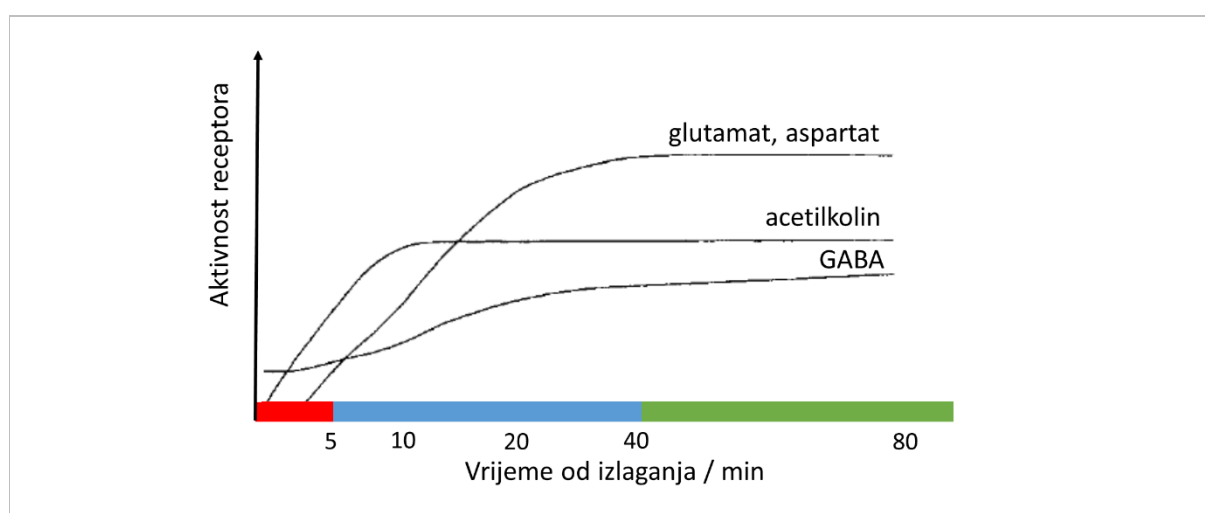
Nakon inhibicije AChE, enzima koji sudjeluje u kontroli kolinergične neurotransmisije u perifernom i središnjem živčanom sustavu (SŽS), dolazi do nakupljanja neurotransmitera acetilkolina (ACh) u sinaptičkim pukotinama i prekomjerne stimulacije acetilkolinskih muskarinskih (mAChR) i nikotinskih (nAChR) acetilkolinskih receptora te do specifičnih simptoma (**tablica 2.3**).⁷

Tablica 2.3. Znakovi ili simptomi trovanja organofosforim spojevima podijeljeni prema zahvaćenim organima i uzrokovani stimulacijom muskarinskih (mAChR) i/ili nikotinskih (nAChR) receptora.⁸⁰

Organ / tkivo / funkcija (Receptor)	Znakovi i simptomi
Periferija	
Oko (mAChR)	mioza, suženo vidno polje, mutan vid, suženje oka
Nazofarinks (mAChR)	rinoreja, salivacija
Respiracijski trakt (mAChR)	bronhokonstrikcija, bronhoreja
Gastrointestinalni trakt (mAChR)	mučnina, povraćanje, abdominalni grčevi, proljev
Koža (nAChR)	znojenje
Mokraćni mjehur (mAChR)	urinacija
Kardiovaskularni sustav (mAChR)	bradikardija, početna tahikardija i hipertenzija; srčani zastoj
Skeletni mišići (nAChR)	fascikulacije, hiperrefleksija, grčenje mišića, slabost; paraliza mišića
Simpatički gangliji (nAChR)	prolazna tahikardija i povećanje krvnog tlaka
Središnji živčani sustav	
Respiracija (mAChR)	smanjenje brzine i dubine disanja, zastoj disanja
Aktivnost (mAChR, nAChR)	nemir, slabost, tremor, ataksija, epileptički napadaji
Ponašanje (mAChR, nAChR)	noćne more, nesanica, labilnost

Mjerenjem aktivnosti kolinesteraza u krvi može se utvrditi da je osoba bila izložena OP spojevima, ali i pratiti učinak terapije. Vidljivi učinci na razini cijelog organizma nakon akutnog izlaganja OP spojevima se javljaju tek kada je eritrocitna AChE inhibirana 75 – 80 %.¹⁵ Najosjetljiviji i specifični simptomi izlaganja OP spojevima su suženje zjenice (mioza) i rinoreja te su oni prisutni i kada je aktivnost kolinesteraza u krvi još nepromijenjena.^{15,81} Ostali blagi i umjereni simptomi trovanja OP spojevima uključuju glavobolju, mučninu, vrtoglavicu,

povraćanje, abdominalne grčeve, proljev, znojenje, slinjenje, suženje očiju, tremor, fascikulacije lokalnog mišićja, nervozu i nemir, umor i lošu koordinaciju.⁸¹ Osim simptoma poremećaja kolinergičnog sustava, javlja se i niz drugih neželjenih učinaka te poremećaja specifičnih za promjenu u radu ostalih neurotransmiterskih sustava (pr. glutamat i γ -aminomaslačna kiselina, tj. GABA) direktno zbog inhibicije AChE, ali i zbog ostalih neposrednih učinaka OP spojeva. Stoga se manifestacija trovanja uzrokovana akutnim izlaganjem OP spojevima može podijeliti na tri faze ovisno o simptomima koji prevladavaju: kolinergična faza, kolinergično-glutamatergična faza i glutamatergično-ekscitotoksična faza u kojoj dolazi do oštećenja mozga (slika 2.4).^{7,82}



Slika 2.4. Aktivnost receptora različitih neurotransmitera u središnjem živčanom sustavu ovisna o vremenu od izlaganja živčanom bojnom otrovu te vremensko trajanje kolinergične (crveno), kolinergično-glutamatergične (plavo) i glutamatergično-ekscitotoksične (zeleno) faze trovanja. Slika preuzeta iz ref. 7 i prilagođena.

Glavni uzrok brze smrti, koja pri izlaganju većim dozama otrova nastupa unutar nekoliko minuta, je zatajenje dišnog sustava uslijed paralize mišića koji potpomažu disanje, te bronhokonstrikcije u kombinaciji s pojačanom bronhijalnom sekrecijom i depresijom respiracijskog centra u produženoj moždini.^{67,81} Osim toga, u kolinergičnoj fazi dolazi i do pojave napadaja koje, skupa sa zatajenjem disanja, otežavaju oporavak i mogu rezultirati smrću ako se pravovremenim i učinkovitim tretmanima ne suzbiju.^{7,83}

Istraživanja na modelima miševa kod kojih je uklonjen gen (engl. *knockout*) za protein koji veže AChE u sinapsama mozga (tzv. PRiMA KO) ili gen za ukupnu AChE (AChE KO) su pokazala da miš može preživjeti i s vrlo malom aktivnošću AChE u SŽS-u (2 % koncentracije divljeg tipa) i općenito bez AChE aktivnosti (AChE KO). S obzirom da fenotip PRiMA KO

miševa nije značajno drugačiji od fenotipa miša s genima divljeg tipa, a AChE KO miševi pokazuju lošu lokomotornu aktivnost, sklonost brzom umoru te tremore, zaključeno je da za normalno funkcioniranje organizma AChE ima značajniju ulogu u neuromuskularnim sinapsama nego u SŽS-u.^{84,85} Međutim, u PRiMA KO modelu miša uočena je i prilagodba organizma visokim koncentracijama ACh u mozgu u obliku smanjenja ekspresije mAChR i nAChR receptora.⁸⁴ S druge strane, kolinergični neuroni u SŽS-u su, osim u kontroli motorike, uključeni i u funkcije poput pažnje, kognitivnih sposobnosti, učenja, pamćenja, kontrole spavanja i budnosti, i dr.⁸⁶⁻⁸⁸ Stoga je pokazano da produljeni napadaji (*status epilepticus*) uzrokovani trovanjem OP spojevima uzrokuju ireverzibilne dugotrajne poremećaje kognitivnih i bihevioralnih funkcija kod preživjelih zbog propadanja neurona primarno u hipokampusu i centralnom korteksu mozga.^{11,12,23,32,89} Mehanizmi koji dovode do propadanja neurona i nastanka lezija u mozgu uključuju već spomenute poremećaje različitih neurotransmiterskih sustava (pr. glutamatna ekscitotoksičnost, ali i poremećaji inhibicijskih neurotransmiterskih sustava poput sustava GABA),^{7,14,15} ali su vidljive i konkretne promjene na staničnoj razini poput povećanja unutarstaničnog kalcija,⁷ povećanje koncentracije proupalnih čimbenika kao i proapoptoznih signalnih molekula²⁵ te povećano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS).^{24,25,90} OP spojevi mogu reagirati i direktno s mAChR, nAChR i glutamatnim receptorima u SŽS-u neovisno o inhibiciji AChE.¹⁵ Pokazano je da VX preko interakcije s nAChR uzrokuje povećano otpuštanje ACh iz presinaptičkih živčanih stanica.²¹ Za soman je uočeno da pri subakutnim dozama uzrokuje promjene u koncentraciji mAChR u bronhima i tkivu pluća štakora,⁹¹ dok je u drugom istraživanju pokazano da soman aktivira ekscitacijske glutamatne receptore.^{17,18} U podlozi nastanka napadaja sličnih epileptičnim napadajima može biti i utjecaj OP spojeva na inhibicijski GABA-ergični neurotransmiterski sustav kao što je pokazano za VX i sarin.^{16,20} Utjecaj OP spojeva na GABA-ergični prijenos živčanog impulsa u SŽS-u povezuje se s promjenama u ponašanju laboratorijskih životinja i ljudi (bihevioralni poremećaji), ali i s izazivanjem napadaja pri većim dozama.¹⁵ Također, pokazano je da kod subletalnih doza OP spojeva dolazi do bihevioralnih promjena u zamoraca,⁹² ali i do dugotrajnih poremećaja kognitivnih funkcija zbog utjecaja na smanjenje ekspresije receptora nAChR i mAChR u SŽS-u.^{12,22}

Osim dugotrajnih posljedica izlaganja OP spojevima zbog oštećenja nastalih u SŽS-u i djelovanja na AChE inhibiciju, uočene su i dugotrajne posljedice vezane uz periferni živčani sustav zbog inhibicije esteraze NTE. Sindrom koji pritom nastaje se naziva odgođenom

polineuropatijom potaknutom OP spojem (OPIDP od engl. *organophosphate-induced delayed neuropathy*), a uključuje lošu koordinaciju mišića, utrnulost, umor, grčevitu bol te može rezultirati izraženom mišićnom slabosti i paralizom donjih udova.^{81,93}

Simptomi i posljedice trovanja OP spojevima u ljudi su zabilježeni i praćeni nakon terorističkih napada devedesetih godina 20. stoljeća u Japanu kada su ljudi bili izloženi sarinu. Žrtve su uglavnom pokazale simptome poput mioze, glavobolje, problema s vidom, boli u očima, dispneje, mučnine, kašlja, grlobolje, zamagljen vid te rinoreju koji karakteriziraju blaže do umjereno trovanje. Međutim, kod težih otrovanja došlo je do zatajenja disanja te pojave napadaja. Neke preživjele žrtve napada u Tokiju su pokazale promjene u psihomotornoj funkciji, percepciji, pažnji, učenju i pamćenju te promjene raspoloženja 6 – 8 mjeseci nakon izlaganja otrovu.^{13,23,94} Također, i kod veterana Zaljevskog rata koji su bili izloženi sarinu i ciklosarinu je zabilježen niz neuroloških simptoma, kao i veća učestalost tumora mozga dvije godine nakon izlaganja živčanim bojnim otrovima, iako je u tom specifičnom slučaju teško povezati uzroke i posljedice zbog izloženosti vojnika različitim vrstama kemijskog oružja.⁸⁹ Neurobihevioralni poremećaji, poremećaji u učenju i pamćenju uočeni su i kod poljoprivrednih radnika koji su koristili OP pesticide.^{81,95}

Današnja farmakološka terapija, koja se primjenjuje u medicinskoj praksi nakon akutnog izlaganja OP spojevima, sastoji se od atropina (antimuskarinik, antagonist mAChR), koji umanjuje učinke prekomjerne stimulacije muskarinskih receptora, te od reaktivatora inhibirane AChE (oksima) koji povratkom aktivnosti enzima utječu na razgradnju akumuliranog ACh i tako vraćaju kontrolu nad kolinergičnom neurotransmisijom. Dodatno se primjenjuju i antikonvulzivi iz klase benzodiazepina (agonisti GABA-A receptora; npr. diazepam ili njegov prolijevak avizafon) kako bi se umanjili ili zaustavili napadaji i time spriječilo oštećenje mozga.⁸³ Za vojne svrhe dostupni su i lijekovi za predtretman, tj. lijekovi za primjenu prije možebitnog izlaganja kemijskom oružju. Pokazano je da vjerojatnost nastupa napadaja, kao i vrijeme nastupa napadaja, ovisi o tipu živčanog bojnog otrova i primijenjenoj terapiji odnosno predtretmanu (**tablica 2.4**).^{96,97} U ispitivanjima na štakorima, kada je u predtretmanu primijenjen samo atropin, V agensi (VX i VR) su pokazali veću učestalost pojave napadaja od somana ili sarina. Međutim kada su u predtretmanu upotrijebljeni oksimi HI-6 ili 2-PAM ili piridostigmin (karbamatni inhibitor AChE koji štiti od inhibicije enzima OP spojevima) uz atropin, VX je pokazao puno manju učestalost i sporiji nastup napadaja od ostalih živčanih

bojnih otrova kod kojih učestalost pojave napadaja od oko 70 – 100 % korelira i s brzim nastupom napadaja (2,6 – 7,7 minuta) od vremena izlaganja otrovu. Dodatno, ispitivanja provedena na zamorcima izloženim sarinu, somanu, VX-u i VR-u pokazala su da je kod životinja, kod kojih su se razvili napadaji, došlo i do povećanja koncentracije ACh u mozgu.⁹⁷ Također, aktivnosti AChE u krvi razlikovala se između životinja kod kojih su se javili napadaji i onih kod kojih nisu, a smrt je nastupila samo u životinja koje su imale napadaje.⁹⁷ Stoga potraga za prikladnom terapijom, koja će imati djelovanje u SŽS-u i spriječiti kaskadu toksičnih učinaka OP spojeva uslijed inhibicije AChE u mozgu, i dalje traje.

Tablica 2.4. Učestalost pojave i vrijeme nastupa napadaja nakon subkutane primjene živčanih bojnih otrova.

OP spoj	Soman	Tabun	Ciklosarin	Sarin	VX	VR
Zamorac: predtretman atropinom te 1xLD₅₀ OP^a						
Pojava napadaja / %	68	/	/	42	84	80
Nastup napadaja / min	23	/	/	18	41	33
Štakor: predtretman HI-6 (125 mg kg⁻¹) + 1,6xLD₅₀ OP + tretman atropin (2 mg kg⁻¹)^b						
Pojava napadaja / %	100	100	78	68	0	/
Nastup napadaja / min	3,7	4,2	2,7	3,6	/	/
Štakor: predtretman 2-PAM (25 mg kg⁻¹) + 1,6xLD₅₀ OP + tretman atropin (2 mg kg⁻¹)^b						
Pojava napadaja / %	100	100	100	98	33	/
Nastup napadaja / min	3,9	3,2	2,6	4,7	19	/
Zamorac: predtretman piridostigminom + 2xLD₅₀ OP + tretman atropin (2 mg kg⁻¹), 2-PAM (25 mg kg⁻¹)^b						
Pojava napadaja / %	100	95	92	73	50	/
Nastup napadaja / min	7,6	6,3	7,5	7,7	21,3	/

^aPodaci iz ref. 97; ^bPodaci iz ref. 96.

2.2. Kolinesteraze kao glavna meta OP spojeva i terapije trovanja OP spojevima

2.2.1. Općenito o kolinesterazama

Kolinesteraze prema enzimskoj nomenklaturi spadaju u hidrolaze estera karboksilnih kiselina (EC 3.1.1) te podobitelj serinskih esteraza, a općenito kataliziraju hidrolizu kolinskih estera i karboksilnih estera. Također, zbog karakterističnih sekundarnih i tercijarnih struktura podjedinice enzima, tj. 12 β-nabranih ploča okruženih s 14 α-uzvojnica, kolinesteraze se ubrajaju u obitelj α/β-hidrolaza. Ista α/β-struktura uočena je i u izvanstaničnim domenama nekih adhezivnih proteina (pr. neurotakin, glutaktin, gliotaktin u *Drosophila melanogaster* te neuroligin kod sisavaca). Upravo ta homologija s adhezivnim proteinima pretpostavlja dodatne nekatalitičke funkcije kolinesteraza temeljem protein-protein interakcija. U kolinesteraze se ubrajaju dva srodna enzima: AChE (tzv. prava kolinesteraza) i BChE (tzv.

pseudokolinesteraza). Ljudska AChE je kodirana genom na kromosomu 7, dok je ljudska BChE kodirana genom na kromosomu 3, a u konačnici ova dva enzima unutar pojedine vrste dijele oko 50 % homologije u primarnoj strukturi proteina (**tablica 2.5**).⁹⁸

Tablica 2.5. Osnovne razlike između dva srodna ljudska kolinesterazna enzima, AChE i BChE.

	AChE (EC 3.1.1.7)	BChE (EC 3.1.1.8)
Lokacija gena	7q22	3q26.1-q26.2
Veličina podjedinice^a	543 ak, 67 376 Da	602 ak, 68 418 Da
Tip podjedinice^b	1. Sinaptička AChE-T (engl. <i>tailed</i>) 2. Eritrocitna AChE-H (engl. <i>hydrophobic</i>) 3. AChE-R (engl. <i>readthrough</i>)	1. Isključivo T tip BChE

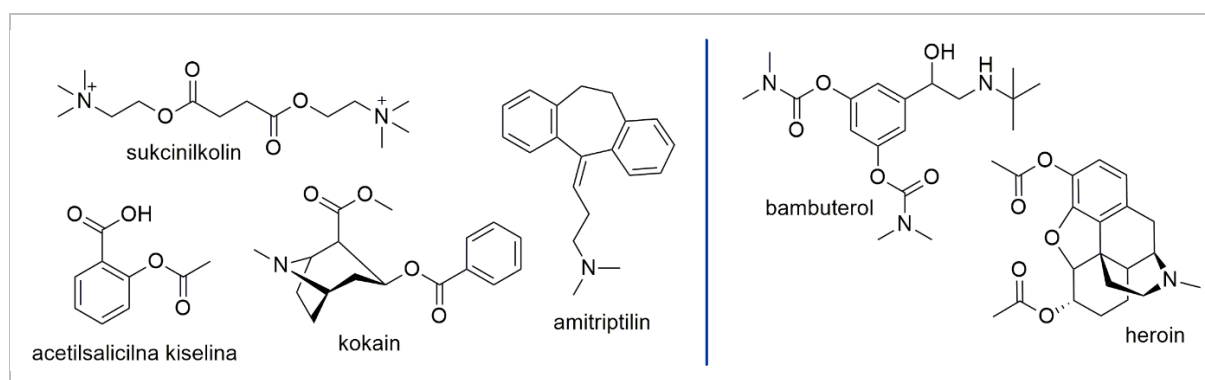
^abroj aminokiselinskih ostataka (ak) i masa (Da) zrele podjedinice, preuzeto sa *Human Protein Reference Database* (HPRD);

^bVarijante nastale alternativnim cijepanjem pre-mRNA.

Alternativnim cijepanjem pre-mRNA AChE nastaju tri različite varijante AChE enzima (T, H ili R tip; **tablica 2.5**) drugačijih fizikalno-kemijskih svojstava koje predodređuju konačni molekularni oblik enzima.^{99,100} BChE ne prolazi kroz proces alternativnog prekrajanja, te postoji isključivo kao T tip polipeptidnog lanca.¹⁰¹ Općenito, s obzirom na molekularne oblike koje tvore, moglo bi se reći da postoje dvije klase kolinesteraznih enzima: globularni i asimetrični.^{99,100} U klasu globularnih AChE oblika spadaju topljivi oblici (monomeri, homodimeri i homotetrameri) koji se mogu pronaći u većini tkiva te oblici vezani za membranu preko glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra (AChE H tip) ili pomoću transmembranskog PRiMA proteina (engl. *proline-rich membrane anchor*) (AChE T tip). Klasu asimetričnih oblika vezanih za bazalnu laminu izvanstaničnog matriksa tvore tetrameri (1, 2 ili 3) AChE podjedinica (T tip) vezani na trolančani kolagenski rep (ColQ). Navedeni molekularni oblici kolinesteraza različito su lokalizirani u organizmu. U plazmi se uglavnom nalazi BChE u obliku topljivog tetramera (95 %), dok su za membrane eritrocita vezani dimeri AChE (H tip) preko GPI sidra. U konačnici je omjer aktivnosti AChE:BChE u punoj krvi otprilike 4:1.¹⁰² U sinapsama SŽS-a sisavaca uglavnom se nalaze tetrameri AChE vezani na membranu preko proteina PRiMA, dok se u neuromuskularnim sinapsama perifernog živčanog sustava sisavaca uglavnom nalazi asimetrični oblik AChE-ColQ.^{100,103} Dodatno, pokazano je da u neuromuskularnoj sinapsi postoje i tetrameri BChE vezani preko proteina PRiMA na membranu terminalnih Schwannovih stanica koje se nalaze u blizini neuromuskularne sinapse,¹⁰⁴ kao i da se tetrameri BChE vezani pomoću proteina PRiMA nalaze u mozgu.¹⁰³

AChE je visoko konzervirani enzim u sinapsama kolinergičnog sustava gdje sudjeluje, kako je prije navedeno, u kontroli prijenosa živčanog impulsa katalizom hidrolize ACh. Za

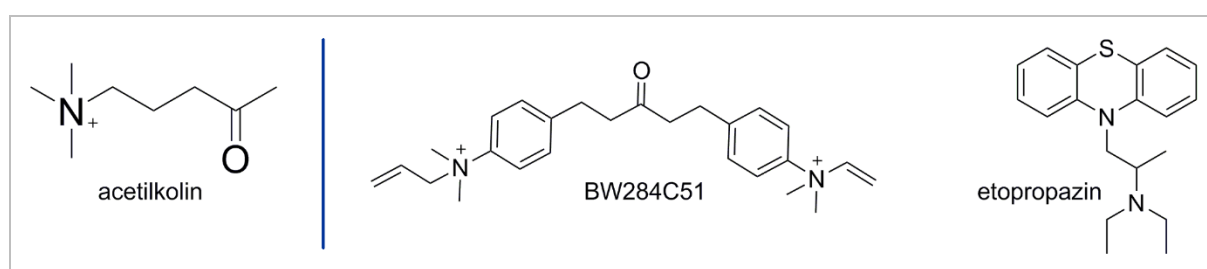
AChE smještena na površini eritrocita se pretpostavlja da ima ulogu u regulaciji imunološkog odgovora razgradnjom ACh kojeg izlučuju krvne stanice te endotelne i epitelne stanice.¹⁰⁵ BChE se nalazi slobodna u krvi, ali i u perifernom živčanom sustavu i SŽS-u, cerebrospinalnoj tekućini, plućima, gušterači te jetri, gdje se najvećim dijelom i sintetizira.^{9,106–108} Esencijalna fiziološka uloga BChE do danas nije razjašnjena i utvrđeno je da postoji više od 40 različitih polimorfizama BChE od kojih neki rezultiraju smanjenom ili nikakvom aktivnošću, te osobe s takvim inačicama BChE nemaju vidljiv poremećaj ili nedostatak.^{9,64} Međutim, pokazano je da BChE sudjeluje u metabolizmu nekih lijekova, štiti AChE od anti-kolinesteraznih supstanci i sudjeluje u razgradnji ACh kojeg izlučuju već navedene stanice izvan živčanog sustava.¹⁰⁵ Iako osobe sa smanjenom aktivnošću odnosno bez aktivnosti BChE nemaju vidljiv fenotip, problem se ipak javlja kada takve osobe uzimaju lijekove ili ksenobiotike čija je hidroliza katalizirana pomoću BChE, a koji time gube (pr. sukcinilkolin, acetilsalicilna kiselina, kokain, amitriptilin) ili dobivaju (pr. bambuterol i heroin) potencijal za farmakološki učinak (**slika 2.5**). Najpoznatiji primjer problema kojeg imaju osobe s nedovoljnom aktivnošću BChE je produžena mišićna paraliza te apneja, ali i moguća smrt kada se prilikom operativnog zahvata primjenjuje miorelaksans sukcinilkolin.⁸ Nadalje, navodi se da BChE sudjeluje i u metabolizmu lipida i lipoproteina te u diferencijaciji i proliferaciji živčanog tkiva, ali i procesu razvoja neurodegenerativnih poremećaja.^{8,9,64} U određenim dijelovima mozga (talamus, hipotalamus) glija stanice eksprimiraju BChE koja pritom ima ulogu u razgradnji ACh u mozgu u Alzheimerovoj bolesti, kao i ključnu ulogu u razgradnji ACh u mozgu miševa bez AChE (PRiMA KO).^{9,109}



Slika 2.5. Primjeri lijekova i/ili ksenobiotika koje BChE hidrolizira i time deaktivira (lijevo) ili aktivira (desno).

2.2.2. Katalitička aktivnost kolinesteraza i interakcije s ligandima

Obje kolinesteraze su hidrolaze iz skupine serinskih esteraza koje karakterizira katalitička trijada serin-histidin-glutamat. Prva kristalna struktura AChE određena je 1991. godine na enzimu izoliranom iz raže *Torpedo californica* (TcAChE),¹¹⁰ dok je kristalna struktura ljudske AChE riješena 2000. godine.¹¹¹ Tada je uz cjelokupnu 3D strukturu AChE, postao jasniji i mehanizam katalize karboksilnih i kolinskih estera, odnosno fiziološkog supstrata ACh (**slika 2.6**). Aktivno mjesto AChE nalazi se u ždrijelu dubokom oko 20 Å, a širokom oko 5 Å. Unutar ždrijela nalazi se 14 visoko očuvanih aromatskih ostataka. BChE ima aktivno ždrijelo analogno ždrijelu AChE, osim što umjesto šest aromatskih aminokiselina ima alifatske aminokiseline¹¹² zbog čega je volumen ždrijela BChE oko 200 m³ veći nego volumen ždrijela AChE.¹¹³ Unutar aktivnog ždrijela kolinesteraza, skupine aminokiselina tvore nekoliko funkcionalno različitih područja (**tablica 2.6**) s karakterističnim ulogama: periferno anionsko mjesto, kolin-vezujuće mjesto, oksianionska šupljina, katalitička trijada te acilni džep.¹¹⁴ Periferno anionsko mjesto služi kao mjesto za vezanje supstrata i produkata na putu u ili iz aktivnog mjesta enzima,¹¹⁴ ali i kao mjesto sidrenja liganada.¹¹⁵ Ligandi koji reagiraju s aminokiselinama perifernog anionskog mjesta nazivaju se „perifernim ligandima“ i oni mogu spriječiti pristup ostalih molekula aktivnom mjestu (npr. dekametonij, fascikulin). Ovo mjesto bitno je i kod selektivne inhibicije kolinesteraza (pr. ligand BW284C51 selektivno inhibira AChE, dok je etopropazin selektivni inhibitor BChE; **slika 2.6**), te je dodatno kod AChE bitno kao mjesto na koje se ACh pri visokim koncentracijama veže i time djelomično doprinosi inhibiciji enzimske aktivnosti.¹¹⁶



Slika 2.6. Formule acetilkolina i selektivnih inhibitora AChE i BChE, spoja BW284C51 odnosno etopropazina.

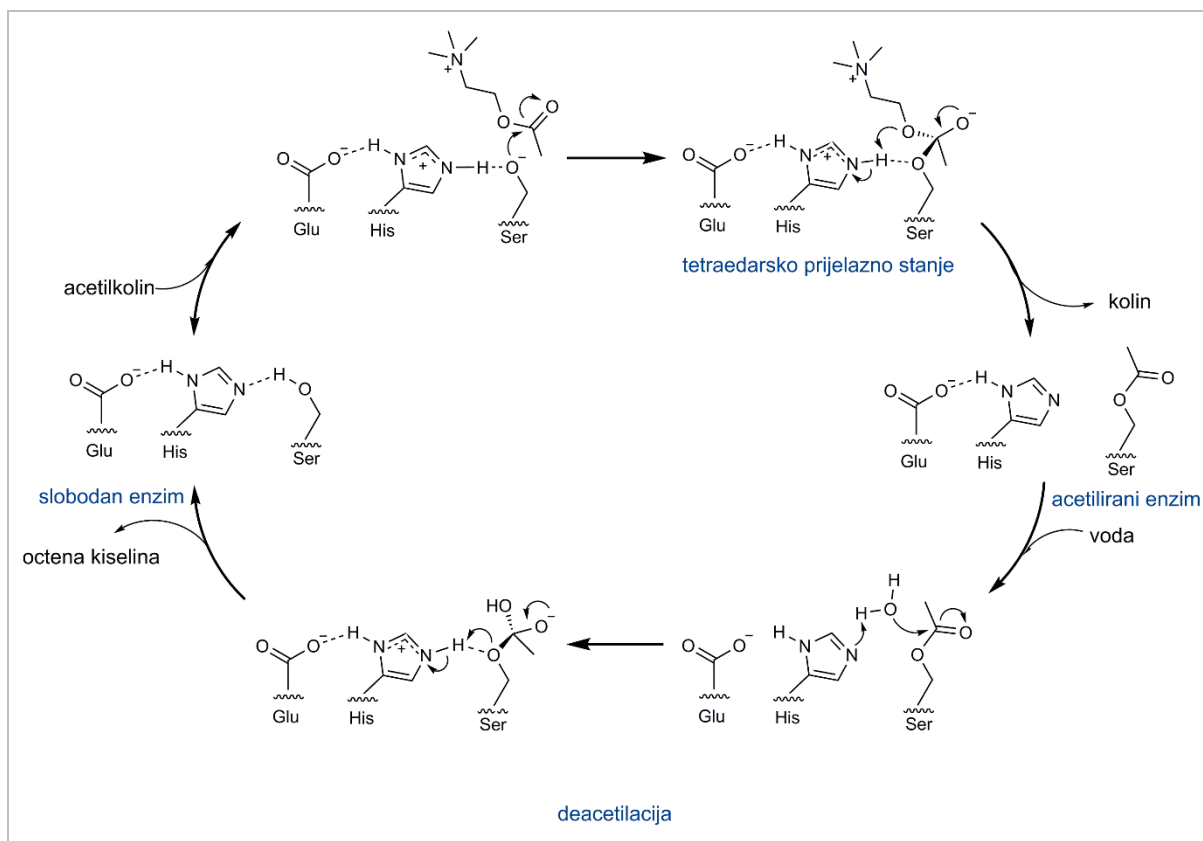
Acilni džep veže acetilnu skupinu ACh s dvije ili više konzervirane aromatske aminokiseline u AChE. Kako se na analognom mjestu dvije aromatske aminokiseline acilnog džepa kod BChE nalaze alifatske aminokiseline, u ždrijelu BChE je dostupan veći prostor za supstrate dužeg i/ili razgranatijeg acilnog repa (pr. propilkolin ili butirilkolin).⁸ Kolinsko mjesto stabilizira pozitivan naboj kvaternog dijela kolinskih supstrata kation- π interakcijama s triptofanom koji

je očuvan i u AChE (Trp86) i BChE (Trp82) te tako omogućava smještanje kolinskih supstrata na način koji ubrzava njihovu hidrolizu. Oksianionska šupljina stabilizira tetraedarsko prijelazno stanje koje nastaje prilikom katalize hidrolize supstrata tako što dolazi do stvaranja vodikovih veza između karbonilnog kisika supstrata i okosnice aminokiselina glicina i alanina. Zbog interakcija (π -kation, π - π , vodikove veze, elektrostatske interakcije, itd.) koje pobočni lanci pojedinih aminokiselina mogu ostvariti s ligandima u aktivnom mjestu, dolazi do različite selektivnosti i specifičnosti kolinesteraze prema određenim supstratima i inhibitorima.

Tablica 2.6. Popis aminokiselinskih ostataka koji tvore funkcionalno različita područja unutar aktivnog ždrijela ljudskih enzima AChE i BChE.

Područje unutar aktivnog ždrijela	AChE	BChE
Katalitičko mjesto	Ser203, Glu334, His447	Ser198, Glu325, His438
Acilni džep	Phe295, Phe297	Leu286, Val288
Kolin-vezujuće mjesto	Trp86, Tyr337, Phe338	Trp82, Ala328, Phe325
Oksianionska šupljina	Gly118, Gly119, Ala204	Gly116, Gly117, Ala199
Periferno alosteričko mjesto	Tyr72, Tyr124, Trp286, Tyr341	Asn68, Gln119, Ala277, Tyr332

Katalitička trijada zaslužna je za konačno esterazno djelovanje kolinesteraza. Hidrolitičkom razgradnjom supstrata ACh nastaju kolin i octena kiselina, a općenito se proces katalize hidrolize kolinskih supstrata može podijeliti na tri reakcijska koraka: nastajanje Michaelis-Mentenčinog tipa kompleksa, aciliranje enzima na katalitičkom serinu te spontano deaciliranje vodom (**slika 2.7**). Preciznije, glutamat modulira histidin tako da u prvom koraku djeluje kao baza koja privlači proton s γ -hidroksilne skupine serina te ga tako čini učinkovitijim nukleofilom. Nukleofilni kisik serina zatim napada karbonilni ugljikov atom ACh molekule čime nastaje tetraedarski kovalentni intermedijer stabiliziran oksianionskom šupljinom. Nakon toga se kolin odcjepljuje, a serin ostaje acetiliran (acilirani enzim). Zatim voda, koja također pod utjecajem histidina postaje učinkovitiji nukleofil, napada karbonilni ugljik acetilnog dijela i preko tetraedarskog intermedijera dolazi do otpuštanja octene kiseline te do povratka enzima u ishodno stanje. Taj korak naziva se korakom deaciliranja i određuje ukupnu brzinu hidrolize supstrata.¹¹⁷ AChE je jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi, kojeg karakterizira visok obrtni broj od oko 400 000 molekula ACh po minuti, te je zapravo brzina katalize hidrolize ACh ograničena samo brzinom njegove difuzije u aktivno mjesto enzima.^{118,119} Zanimljivo, prema računalnim metodama molekularne dinamike pokazano je da je brzina reakcije po aktivnom mjestu tetramera AChE oko 20 – 30% niža od brzine reakcije u monomeru AChE zbog steričkih i/ili elektrostatskih učinaka.¹²⁰

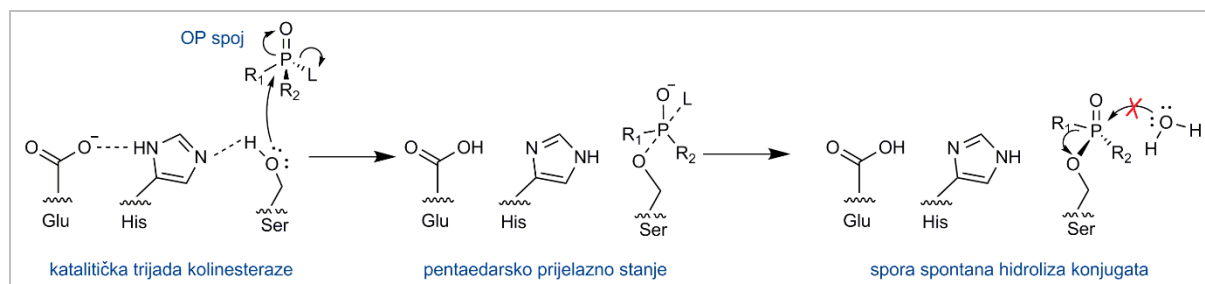


Slika 2.7. Reakcijski koraci u hidrolizi acetilkolina kataliziranoj katalitičkom trijadom Ser-His-Glu kolinesteraza.

Aktivnost kolinesteraza može biti reverzibilno inhibirana raznim ligandima zbog ostvarivanja različitih nekovalentnih interakcija između strukturnih dijelova inhibitora i aminokiselina enzima, ali s povećanjem koncentracije supstrata aktivnost se vraća. Reverzibilni inhibitori kolinesteraza se koriste kao lijekovi, npr. u terapiji Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti ili mijastenije gravis.⁹ Postoji i tzv. pseudo-ireverzibilna inhibicija kolinesteraza uočena kod inhibicije enzima karbamatima (pr. piridostigmin) gdje je korak dekarbamilacije aktivnog serina i oslobađanje aktivnog enzima relativno brz.⁶⁴ U slučaju OP spojeva inhibicija kolinesteraza je ireverzibilna što je pobliže objašnjeno u nastavku.

2.2.3. Inhibicija kolinesteraza OP spojevima i vezane reakcije

OP spojevi su strukturni analozi tetraedarskog prijelaznog stanja koje nastaje prilikom katalitičke hidrolize ACh pomoću kolinesteraze^{64,121} te prilikom interakcije OP spojeva s katalitičkim serinom nastaje pentaedarski intermedijer. Odvajanjem izlazne skupine OP spoja enzim je fosfiliran (**slika 2.8**). Budući da je korak defosfilacije vodom, tj. korak hidrolize OP ostatka izuzetno spor (tzv. spontana reaktivacija), enzim se smatra ireverzibilno inhibiranim.



Slika 2.8. Mehanizam ireverzibilne inhibicije kolinesteraze organofosformim spojem.

OP spojevi kao ireverzibilni inhibitori progresivno inhibiraju ukupnu enzimsku aktivnost i brzina inhibicije se može okarakterizirati konstantom inhibicije drugog reda, k_i . Zbog asimetričnosti aktivnog ždrijela kolinesteraze pokazuju enantioselektivnost prema optički aktivnim spojevima, kakvi su i OP spojevi. Vrijednosti k_i za progresivnu inhibiciju kolinesteraza racematima ili pojedinim stereoizomerima živčanih bojnih otrova te paraoksonom prikazane su u **tablici 2.7**. Pokazano je da (S_P)-izomer somana, sarina i VX-a imaju veće konstante brzine inhibicije AChE enzima, što taj izomer čini toksičnijim.⁶⁷ Zanimljivo je da se (R_P)-izomer somana brže hidrolizira pomoću CarbE ili PON1 enzima, zbog čega je (S_P)-izomer dodatno toksičniji od (R_P)-izomera.⁶⁷

Tablica 2.7. Konstante brzine inhibicije, k_i , kolinesteraza s racematima ili pojedinim stereoizomerima živčanih bojnih otrova te s paraoksonom.^a

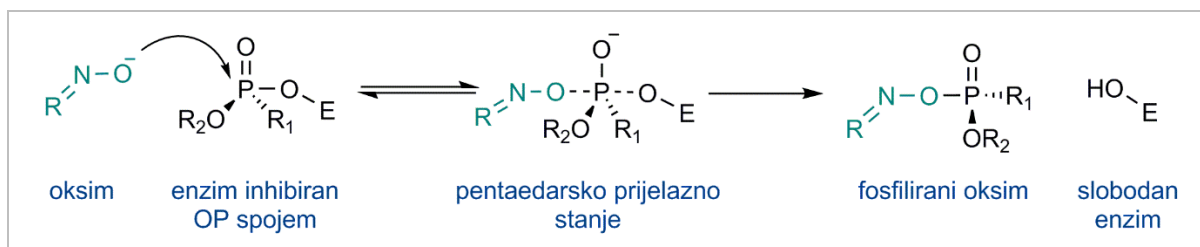
OP spoj	bAChE	hAChE	hBChE
	$k_i / \text{mol}^{-1}\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$		
Racemat sarina	$1,5 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^7$
(R_P)-sarin	$<3 \cdot 10^3$	/	/
(S_P)-sarin	$1,4 \cdot 10^7$	/	/
Racemat ciklosarina	/	$4,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$
Racemat VX-a	$3,2 \cdot 10^7$	$9,9 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^3$
(R_P)-VX	$2,0 \cdot 10^6$	/	/
(S_P)-VX	$4,0 \cdot 10^8$	/	/
Racemat tabuna^b	/	$7,4 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$
Racemat somana	$5 \cdot 10^7$	$9,2 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^8$
(R_C, R_P)-soman	$<1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^6$
(S_C, R_P)-soman	$<1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$	/
(R_C, S_P)-soman	$1,75 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$
(S_C, S_P)-soman	$2,7 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^7$
Paraokson^b	/	$2,2 \cdot 10^6$	/

^aPodaci iz ref. 67; bAChE označava goveđu AChE (engl. *bovine*), dok hAChE i hBChE označavaju ljudsku AChE i BChE;

^bParaokson-etil, podaci iz ref. 122.

Enzim inhibiran OP spojem moguće je reaktivirati pomoću nukleofila snažnijih od vode, pr. reverzibilni inhibitori kolinesteraza s oksimskom skupinom (oksimi) služe kao reaktivatori kolinesteraza inhibiranih OP spojem (**slika 2.9**). Deprotonirana oksimska skupina (oksimat) djeluje kao nukleofil, pa nukleofilni potencijal ovisi o kiselobaznoj konstanti disocijacije, pK_a ,

oksimne skupine za koju je poželjno da bude između 7,3 i 8,0.²⁶ Međutim, ukoliko dođe do spontanog odcjepljenja acilnog dijela OP spoja vezanog na serin kolinesteraze, tj. do dealkilacije ili tzv. starenja (engl. *aging*),¹²³ nastaje konjugat kojeg nije moguće reaktivirati niti pomoću oksima.



Slika 2.9. Reaktivacija kolinesteraze (E) inhibirane organofosforim spojem pomoću oksima.

Vrijednosti za poluvrijeme starenja i spontane reaktivacije pojedinih OP spojeva za slučaj enzima AChE i BChE prikazane su u **tablici 2.8**. Reakcija starenja najznačajnija je kod somana, gdje 50 % inhibirane AChE ostari unutar nekoliko minuta ($t_{1/2} < 2$ min).¹²⁴ Iza somana po brzini starenja odmah slijedi sarin, dok za tabun i VX ta reakcija nije toliko brza. Spontana reaktivacija nije fiziološki značajna niti za jedan živčani bojni otrov, te je u slučaju AChE najsporija spontana reaktivacija konjugata s VX-om ($t_{1/2} = 33$ h). U slučaju OP pesticida s dimetil-fosfatnom skupinom (npr. paraokson-metil) poluvrijeme spontane reaktivacije i starenja su bitno kraća nego li u slučaju OP pesticida s dietil-fosfatnom skupinom (npr. paraokson-etil).³²

Tablica 2.8. Poluvrijeme spontane dealkilacije ($t_{1/2}$ starenja) i spontane reaktivacije ($t_{1/2}$ spontana reak.) ljudske AChE i BChE inhibirane navedenim organofosforim spojevima.^a

OP spoj	AChE		BChE	
	$t_{1/2}$ starenja / h	$t_{1/2}$ spontana reak. / h	$t_{1/2}$ starenja / h	$t_{1/2}$ spontana reak. / h
Sarin	3	/	12	69
Ciklosarin	7	/	2,2	20
VX	36,5	33	77	63
Tabun	19	/	7	/
Soman	0,03 ^c -0,07	n.p.	~0,01	/
Paraokson-etil	31	31	8,6	66,4

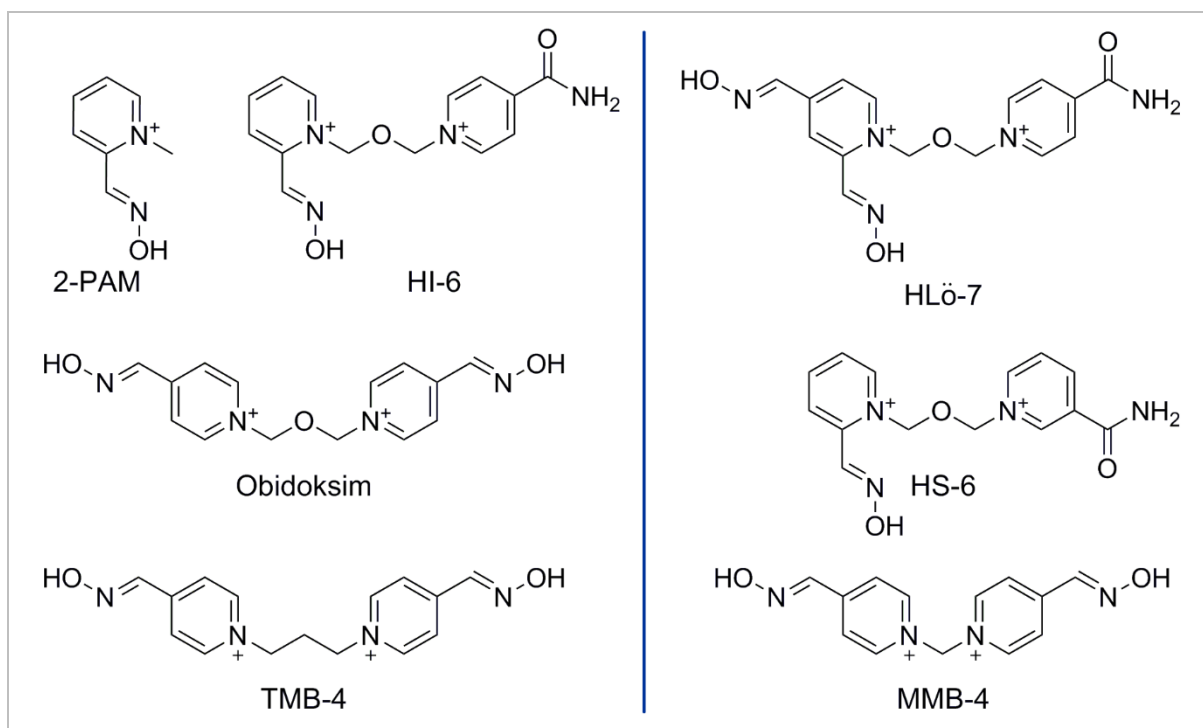
^aOdređeno pri pH 7,4 i 37°C, podaci preuzeti iz ref. 122, 125; n.p.- nije primjenjivo zbog prebrzog starenja.

Učinkovitost reaktivacije kolinesteraze inhibirane OP spojem pomoću oksima ovisi o strukturi samog oksima, ali i o steričkim i elektronskim karakteristikama OP spoja.¹²⁶ Primjerice, oksimi imaju slab ili nikakav reaktivacijski potencijal za AChE inhibiranu tabunom zbog postojanja slobodnog elektronskog para na fosforoamidatu koji omogućuje stvaranje rezonancijskih struktura.¹²⁷ Dodatno, etoksi i dimetilaminska skupina tabuna sterički otežavaju pristup

reaktivatora fosfiliranom serinu,¹²² a uočene su i konformacijske promjene kompleksa tabun-AChE koje uzrokuju smanjenje volumena aktivnog mjesta enzima.^{128,129}

2.3. Razvoj oksimskih reaktivatora inhibiranih kolinesteraza i njihov farmakološki profil

Početak razvoja oksimskih reaktivatora nastupio je kada je Jandorf 1951. uočio da hidroksilamin (NH_2OH) u otopini brzo reagira s OP spojevima i ima detoksifikacijski učinak, a Irwin B. Wilson (1951.) je pokazao da je povratak aktivnosti enzima inhibiranog tetraetilpirofosfatom (TEPP) u prisutnosti hidroksilamina ubrzan.¹³⁰ Davies i Green 1955.,¹³¹ te istovremeno Wilson i Ginsburg, sintetiziraju pralidoksim (2-PAM) koji se i danas koristi u medicinskoj praksi, a koji se ubraja u monopiridinijeve monooksime. Trimedoksim (TMB-4; 1958.) je prvi sintetizirani bispiridinijev bisoksim s propilenskom poveznicom između prstena, a zatim je sintetiziran i njegov strukturni analog s jednim ugljikom između piridinijevih prstena (MMB-4; 1958.).³² U skupinu oksima sintetiziranih u laboratoriju Ilse Hagedorn oksimi ubrajaju se LüH-6 (obidoksim; *Toksogonin*), HI-6 (*Asoxime*; 1966.), HS-6 te HLö-7 (1986.).³² Kasnije, 2000-ih godina, su Kamil Kuča i Kamil Musilek sintetizirali brojne njihove analoge.¹³² U praksi su za upotrebu dozvoljena četiri oksima, tzv. standardni oksimi, 2-PAM, HI-6, obidoksim i TMB-4. Na **slici 2.10** prikazane su strukture navedenih oksima.



Slika 2.10. Formule standardnih oksima (2-PAM, HI-6, obidoksim i TMB-4) i drugih piridinijevih oksima.

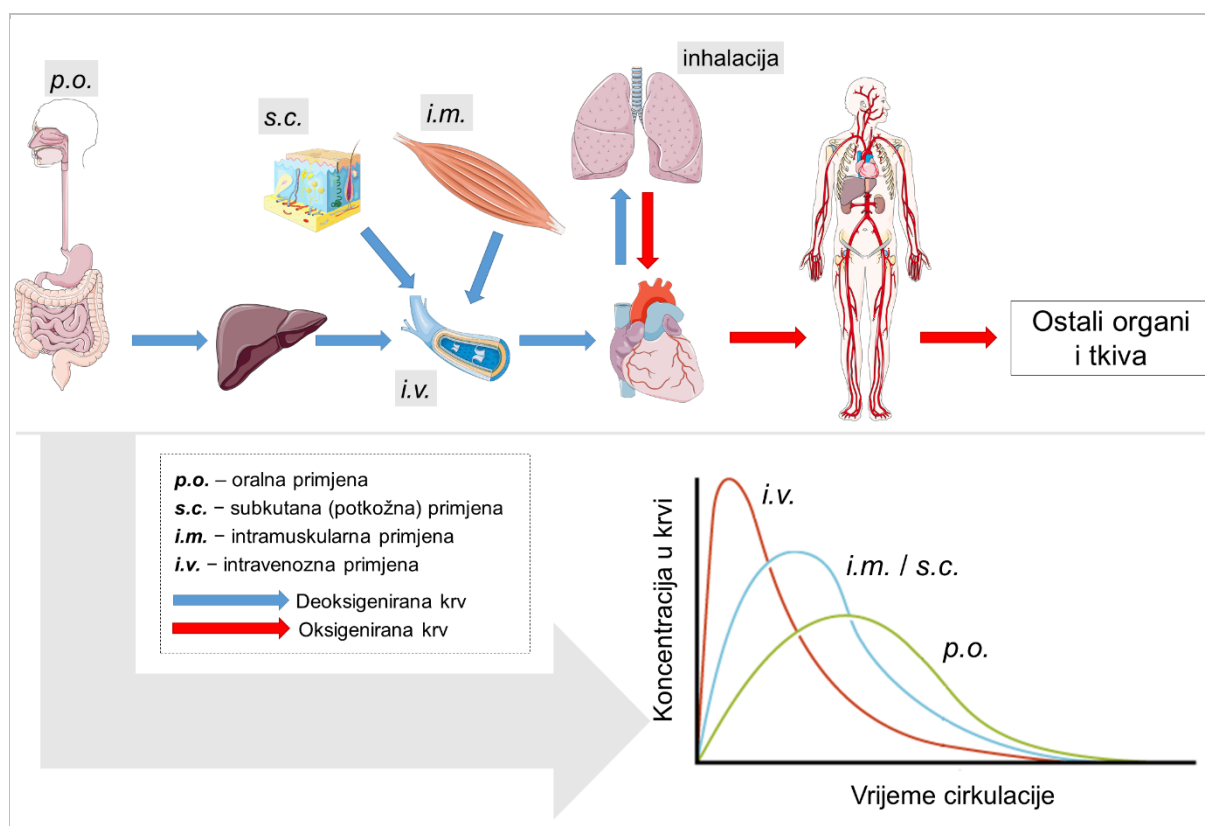
Oksimi su dostupni kao otopine u intramuskularnim autoinjektorima za brzu i jednostavnu primjenu u slučaju izlaganja OP spojevima. Zasad su za primjenu odobreni 2-PAM, koji se koristi u SAD-u i Francuskoj, te obidoksim koji se koristi u Njemačkoj i Češkoj. HI-6 se koristi u vojne svrhe u Kanadi i Švedskoj. U Hrvatskoj je također dostupan 2-PAM. Međutim, farmakološka svojstva navedenih oksima i dalje nisu na zadovoljavajućoj razini, što je pobliže objašnjeno u nastavku.

2.3.1. Osnove farmakologije – farmakodinamika i farmakokinetika lijekova

Farmakološki profil određenog lijeka uključuje njegove farmakodinamičke i farmakokinetičke karakteristike. Farmakodinamika predstavlja učinak lijeka na glavnu farmakološku metu (u slučaju oksima to je AChE inhibirana OP spojem), dok farmakokinetika predstavlja način na koji organizam procesira lijek te obuhvaća nekoliko koraka: apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju lijeka (ADME prema engl. *absorption, distribution, metabolism, excretion*). Na kraju, ukoliko lijek ima zadovoljavajući farmakodinamički i farmakokinetički profil, potrebno je utvrditi da ne pokazuje neželjena nespecifična djelovanja na organizam, tj. da nije toksičan.

Koncentracija lijeka u krvi ovisi o brzini apsorpcije koja ovisi o putu primjene lijeka, o brzini distribucije lijeka u različita tkiva te brzini eliminacije putem jetre ili bubrega (**slika 2.11**). Biodostupnost lijeka, tj. omjer količine lijeka koja je apsorbirana u krvi i primijenjene doze lijeka, također ovisi o putu primjene lijeka. Najveća biodostupnost postiže se intravenoznom (*i.v.*) primjenom i iznosi 100 % aplicirane doze. Najmanja biodostupnost je uglavnom uočena kod oralne primjene lijeka (*p.o.* od lat. *per os*) budući da se iz gastrointestinalnog trakta (GIT) ne apsorbira sva količina primijenjene doze. GIT predstavlja biološku barijeru i pH vrijednosti se razlikuju duž cijelog trakta pr. od jako niskih pH vrijednosti u želucu (1 – 2) do nešto viših pH vrijednosti u tankom crijevu (pH 7,0 – 8,5) što utječe na ionizacijsko stanje lijeka i na njegovu sposobnost da pasivnim transportom prijeđe kroz barijeru u krvotok. Osim toga, u GIT-u može doći do kemijske ili enzimske razgradnje lijeka. Nakon intramuskularne (*i.m.*) primjene koncentracija lijeka u krvi postepeno raste kako se on apsorbira iz mišićnih stanica, a brzina te apsorpcije ovisi o topljivosti lijeka u krvi. Ovaj način primjene vrlo je bitan u slučaju terapije trovanja OP spojevima, jer *i.m.* autoinjektor omogućava jednostavnu i brzu primjenu antidota u slučaju trovanja. Oralna primjena svakako bila metoda

izbora zbog njene neinvazivnosti, ali u tom slučaju biodostupnost lijeka može biti slaba, a početak djelovanja spor.



Slika 2.11. Distribucija lijeka u organizmu te profili ovisnosti koncentracije lijeka u krvi o vremenu proteklom od primjene, a koji ovisne o putu primjene lijeka (*p.o.*, *i.v.*, *i.m.*, *s.c.*).

Nadalje, nakon apsorpcije lijeka u krvotok (pH 7,4), dolazi do njegove daljnje distribucije u organizmu ovisno o njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Lipofilni lijekovi mogu prelaziti preko bioloških barijera i akumulirati se u različitim tkivima. Također, lijek se može vezati na proteine plazme ili tkivne proteine što smanjuje koncentraciju lijeka koja je dostupna za dostavu na ciljno mjesto. Metabolizam odnosno biotransformacija lijeka je najznačajnija kod njegove oralne primjene, kada lijek portalnom venom dolazi u jetru gdje se nalaze glavni enzimski sustavi za biotransformaciju: tzv. enzimi faze I (enzimi citokrom P450 sustava, CYP450 - oksidacija) i faze II (različite reakcije konjugacije, itd.). Supstrati CYP450 su uglavnom lipofilni spojevi¹³³ te se biotransformacijom ishodni lijek može prevesti u hidrofilniji metabolit koji je pogodniji za eliminaciju urinom. Također, biotransformacijom dolazi i do promjene farmakodinamičkih svojstava lijeka, npr. nastali metabolit može pokazivati veću farmakološku aktivnost od ishodnog spoja ili može biti neaktivan. Isto tako, biotransformacijom se može promijeniti toksičan potencijal lijeka. Osim u jetri, enzimi za biotransformaciju su prisutni i u

različitim organima. Konačno, eliminacija hidrofilnih lijekova do određene veličine odvija se filtracijom krvi kroz nefrone kojom ti lijekovi dospijevaju u mjehur (eliminacija urinom), dok se lipofilni lijekovi najčešće eliminiraju putem jetre i žučnog kanala u duodenum tankog crijeva (eliminacija fecesom). Farmakokinetički profil lijeka može se odrediti iz vremenske ovisnosti koncentracije lijeka u krvi ili drugim fiziološkim odjeljcima. Glavni farmakokinetički parametri su poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$), tj. vrijeme potrebno da se 50 % lijeka eliminira iz organizma, zatim maksimalna postignuta koncentracija lijeka u krvi (C_{max}), vrijeme potrebno da se C_{max} postigne (t_{max}) te volumen distribucije (V_d) koji predstavlja fiktivni volumen kojeg lijek zauzima u organizmu i ovisi o njegovoj lipofilnosti. Ukoliko je lijek topljiv u vodi uglavnom će se nalaziti u središnjem odjeljku, tj. krvi i dobro perfundiranim tkivima (pr. jetra i bubrezi) (manji V_d), dok lipofilan spoj pokazuje sposobnost prolaska bioloških barijera i tendenciju akumulacije u tkivima (veći V_d).

2.3.2. Farmakološki profil oksima koji se koriste u medicinskoj praksi te njihovi nedostaci

Oksim 2-PAM pokazuje učinak u reaktivaciji AChE inhibirane sarinom i VX-om, a manje za AChE inhibiranu tabunom i somanom, ali je općenito među standardnim oksimima najmanje učinkovit reaktivator.³² Oksim HI-6 je učinkovit reaktivator AChE inhibirane fluorofosfonatima, tj. somanom, sarinom i ciklosarinom,^{32,134,135} ali je potpuno neučinkovit u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom.⁵⁶ HI-6 je prvi oksim koji se pokazao učinkovitim u poboljšanju ishoda kod otrovanja somanom, a također je među standardnim oksimima najučinkovitiji u reaktivaciji AChE inhibirane ciklosarinom.³² Nedostatak HI-6 u usporedbi s ostalim oksimima je njegova nestabilnost u vodenim otopinama što otežava njegovu pohranu i dostupnost za primjenu na terenu.³² Prema usporedbi s ostalim oksimima, obidoksim se pokazao dobrim reaktivatorom AChE inhibirane tabunom, zatim sarinom i VX-om.³² Također, učinkovit je reaktivator za AChE inhibiranu većinom OP pesticida. Nadalje, TMB-4 se pokazao učinkovitim reaktivatorom AChE inhibirane tabunom, zatim sarinom i VX-om, ali ne i somanom.³² Međutim, TMB-4 je najtoksičniji oksim među standardnim oksimima.^{32,136} Osim standardnih oksima, neki od srodnih oksima su pokazali dobru reaktivacijsku učinkovitost iako još nisu odobreni za medicinsku upotrebu. Primjerice, oksim HLö-7 je jedini pokazao reaktivaciju AChE inhibirane tabunom, sarinom, somanom, VX-om i ciklosarinom, a od srodnog oksima HI-6 je učinkovitiji u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom i VX-om.¹³⁷ Oksim MMB-4, analog TMB-4, se pokazao učinkovitim reaktivatorom fosfilirane AChE, a

ustanovljen je i njegov dodatan antimuskarinski učinak.³² Neki od tzv. K-oksima su se pokazali iznimno učinkovitima u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom, npr. oksimi K027, K048 i K203,^{56,58} pogotovo u reaktivaciji AChE inhibirane OP pesticidima.¹³⁸

Općenito, učinkovitost oksima u reaktivaciji inhibirane AChE može se povezati s njegovim strukturnim karakteristikama. Tako primjerice AChE pokazuje veći afinitet prema bispiridinijevim oksimima nego prema monopiridinijevim oksimima zbog čega bispiridinijevi oksimi imaju bolji potencijal u reaktivaciji inhibirane AChE.¹³⁹ Također, položaj oksimske skupine ima bitnu ulogu u reaktivacijskoj učinkovitosti oksima, te je općenito *orto*- i *para*-položaj oksimske skupine povoljniji za reaktivaciju od *meta*-položaja zbog ovisnosti pK_a vrijednosti oksimske skupine o njenom položaju na piridinijevom prstenu. Nadalje, oksimi s oksimskom skupinom u *para*-položaju su učinkovitiji reaktivatori AChE inhibirane tabunom ili OP pesticidima nego oksimi s oksimskom skupinom u *orto*-položaju, dok je u reaktivaciji AChE inhibirane ciklosarinom povoljniji *orto*-položaj oksimske skupine. S druge strane, u reaktivaciji AChE inhibirane sarinom ili VX-om, položaj oksimske skupine nije toliko značajan. Ulogu u učinkovitosti reaktivacije inhibiranog enzima ima i duljina poveznice između piridinijevih prstena kod bispiridinijevih oksima.¹³⁹ Kada je riječ o *n*-metilenskoj poveznici, uočeno je da su u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom, sarinom i VX-om, najučinkovitiji reaktivatori s poveznicom od tri ili četiri metilenske skupine, dok je za ciklosarin najpotentniji reaktivator bio onaj s jednom metilenskom skupinom u poveznici (tj. MMB-4). Modifikacije u poveznici, poput uvođenja nezasićenih veza ili heteroatoma, utječu na rigidnost oksima i njegov potencijal za ostvarivanje interakcija s enzimom (npr. zbog prisutnosti slobodnih elektrona).

Nadalje, osim učinkovitosti reaktivatora u reaktivaciji, bitno je da se oksim dostavi na ciljno mjesto djelovanja u organizmu u dovoljnoj koncentraciji te da je tamo dovoljno dugo kako bi postigao optimalan farmakološki učinak. Općenito, pozitivno nabijeni piridinijevi oksimi imaju međusobno slične farmakokinetičke karakteristike. Uglavnom se svi dobro i brzo apsorbiraju (5 – 10 minuta) nakon *i.m.* primjene. Isto tako, dolazi do brze distribucije u dobro perfundirana tkiva i mukopolisaharidima bogata tkiva, ali i brze eliminacije renalnim putem. Njihova biotransformacija u organizmu nije značajna za njihovu biološku aktivnost, tj. standardni oksimi se uglavnom izlučuju nepromijenjeni urinom, osim oksima HI-6 koji se djelomično metabolizira i nastali hidrofilni metaboliti se također eliminiraju urinom. Poluvrijeme života svih oksima u organizmu je relativno kratko te su oni nakon nekoliko sati u

potpunosti eliminirani iz organizma. Terapijska, tj. djelotvorna koncentracija u krvi je prisutna i kraće, pa je svakako potrebno više puta aplicirati antidot do postizanja potpunog terapijskog učinka. Farmakokinetički nedostatak standardnih reaktivatora je i slab prolazak kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) te posljedično slabo djelovanje lijeka u SŽS-u. Prolazak standardnih oksima u SŽS je minimalan zbog njihovog trajnog pozitivnog naboja na kvaternom dušikovom atomu koji otežava pasivni transport kroz KMB-u. Postignute koncentracije HI-6 u mozgu jednake su 10 %-tnom iznosu njegove koncentracije u krvi¹⁴⁰, dok su koncentracije obidoksima u mozgu tek oko 3 – 5 % njegove koncentracije u krvi.²⁷ Utvrđena prolaznost 2-PAM oksima kroz KMB-u također iznosi približno 6 – 10 % njegove koncentracije u plazmi.^{29,141–143} Iako je za 2-PAM i obidoksim predloženo da prelaze kroz KMB-u koristeći transport potaknut proteinskim nosačima,^{28,32} navedene ostvarene koncentracije u mozgu su i dalje relativno niske. Koncentracija oksima u SŽS-u i potrebna reaktivacija AChE u mozgu je kontroverzna tema, budući da neka istraživanja upućuju da je za preživljenje OP otrovanja dovoljan povratak aktivnost AChE od 5 – 20 % u određenim područjima mozga⁸² dok drugi autori preispituju takvu tvrdnju.¹⁴⁴ Međutim, zbog svih navedenih direktnih i indirektnih učinaka OP spojeva, vidljivo je da je potrebno usmjeriti istraživanja na smanjenje akutnih i dugotrajnih neželjenih neuroloških učinaka povećanjem djelovanja novih oksima na razini SŽS-a.

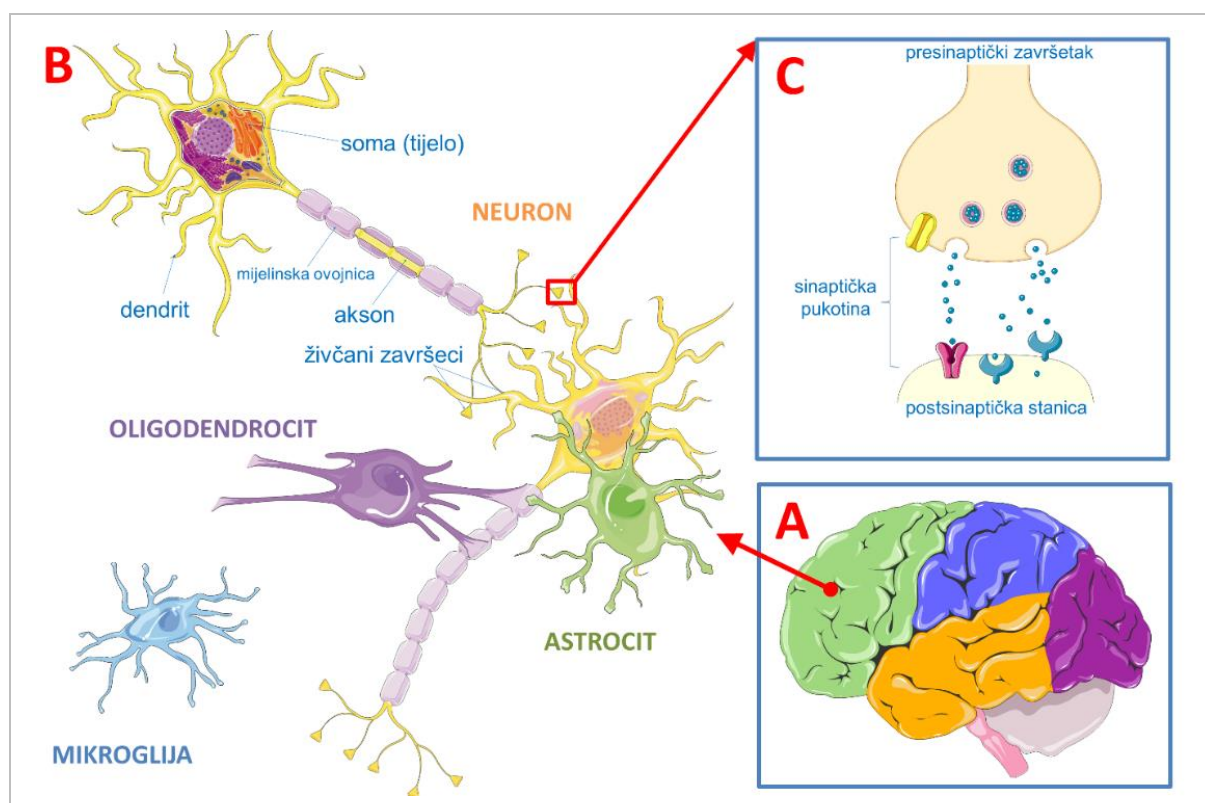
2.4. Dizajn reaktivatora s djelovanjem u središnjem živčanom sustavu

2.4.1. Središnji živčani sustav

Mozak i leđna moždina čine SŽS, a živčano tkivo sačinjavaju neuroni i glija stanice koje se dijele na astrocite, oligodendrocite i mikrogliju (**slika 2.12.A**). Temeljna funkcionalna jedinica SŽS-a jest neuron (**slika 2.12.B**) koji kemijskim i električnim signalima komunicira s ostalim neuronima i stanicama u svom okruženju i to predstavlja osnovni princip funkcioniranja organizma. Mjesto gdje se živčani impuls prenosi između dva neurona ili neurona i druge ciljne stanice (npr. mišićne ili žljezdane stanice) naziva se sinapsom, a sastoji se od presinaptičkog živčanog završetka, sinaptičke pukotine te postsinaptičke stanice (**slika 2.12.C**). Točnije, sinapsa između živčane i mišićne stanice naziva se neuromuskularnom sinapsom.

Za ispravno i kontrolirano prenošenje živčanog impulsa potrebna je stroga kontrola mikrookoline neurona (pogotovo ionske), tj. održavanje homeostaze, pri čemu ključnu ulogu ima barijera između krvi i središnjeg živčanog sustava – KMB, a koja se nalazi na mjestu gdje

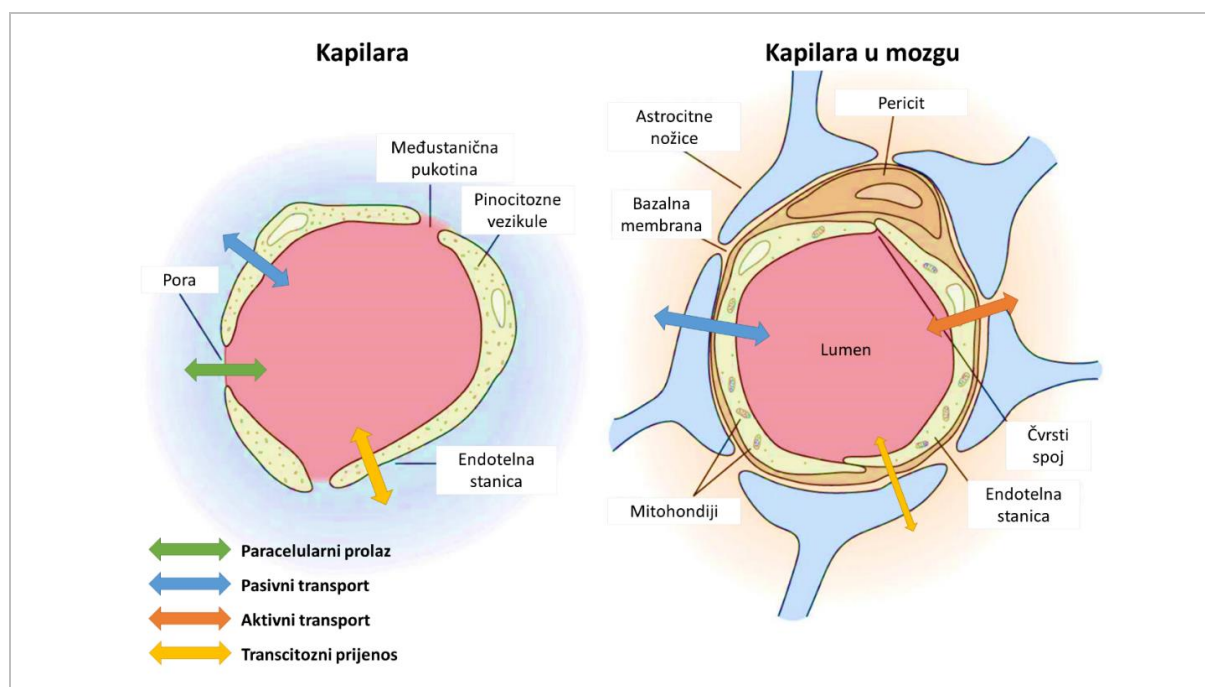
moždane kapilare zadiru u moždani parenhim.¹⁴⁵ KMB štiti SŽS sprječavajući nekontroliran prolaz endogenih (čak i esencijalnih) tvari, a pogotovo prolaz egzogenih tvari koje su potencijalni neurotoksini, iz krvotoka (periferije) u prostore mozga i leđne moždine.¹⁴⁶ Osnovna jedinica KMB-e je tzv. neurovaskularna jedinica, koja se sastoji od endotelne stanice krvne žile, pericita te od glija stanica (astrociti) i to je ono što moždane kapilare razlikuje od kapilara u ostalim dijelovima tijela (**slika 2.13**).¹⁴⁷ KMB, dakle, predstavlja fizičku barijeru za molekule u krvi, ali i transportnu te metaboličku barijeru što je objašnjeno u nastavku.



Slika 2.12. A) Prikaz mozga s različito obojanim režnjevima, B) Stanice koje sačinjavaju živčano tkivo: neuroni i glija stanice (oligodendrociti, astrociti i mikroglia), C) Prikaz sinapse koja se sastoji od presinaptičkog završetka neurona, sinaptičke pukotine te postsinaptičke stanice (neuron, mišićna ili žljezdana stanica).

Fizička barijera KMB-e temelji se na tzv. čvrstim spojevima (engl. *tight junctions*) između lateralnih membrana endotelne stanice krvnih žila. Ključni proteini čvrstih spojeva su okcludini, klaudini, adhezivne molekule međustaničnih spojeva (JAM od engl. *junctional adhesion molecules*) i adhezivne molekule selektivne za endotelne stanice (ESAM od engl. *endothelial cell-selective adhesion molecule*), te tzv. *zonula occludin* (ZO) proteini. Zbog čvrstih spojeva je paracelularni prolaz tvari u zdravom organizmu neznatan,^{145,146} odnosno paracelularno mogu prolaziti tek male hidrofobne molekule i ioni.¹⁴⁹ Glavnina prijenosa molekula kroz KMB-u

odvija se transcelularno – pasivnom difuzijom, olakšanom difuzijom te aktivnim transportom ili nešto manje transcitozom (pinocitozom ili endocitozom). Pasivna difuzija moguća je za male nepolarne molekule (plinovi O₂, CO₂, amonijak; ali i bikarbonatni ion), ali i za veće molekule koje zadovoljavaju određene fizikalno-kemijske karakteristike. Zbog manjeg broja pinocitoznih vezikula u endotelnim stanicama, transport endocitozom (transcitozom) je ograničen, ali ipak prisutan.^{145,147}

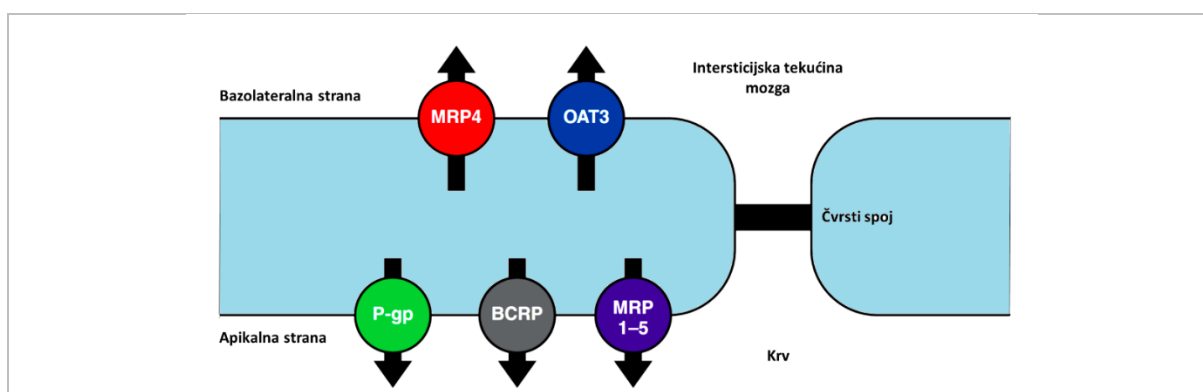


Slika 2.13. Razlika u građi osnovne kapilare i moždane kapilare koja uvjetuje i različit paracelularni, transcelularni (pasivni ili aktivni) i transcitozni prijenos molekula iz krvi u tkiva. Slika preuzeta iz ref. 148 i prilagođena.

Dvije vrste prijenosa kroz KMB-u putem vezikularnih mehanizama su transcitoza potaknuta receptorom (RMT, od engl. *receptor-mediated transcytosis*) te transcitoza potaknuta adsorpcijom (AMT, od engl. *adsorptive-mediated transcytosis*) i uglavnom su odgovorne za unos peptida i proteina u SŽS.^{145–147,150} RMT se odvija prihvaćanjem određenog liganda za receptor čime nastaje kalveola koja se odvaja u vezikulu, tj. dolazi do internalizacije liganda i receptora, a disocijacija liganda se događa ili tijekom staničnog prijenosa ili tijekom egzocitoze na abluminalnu stranu (pr. fizioloških i egzogenih liganada za receptore koji se nalaze na endotelnim stanicama KMB-e su: transferin, lipoproteini, Apo-E, amiloid-β, laktoferin, 2-makroglobulin, glikozilirani proteini, amfotericin, IgG, inzulin, leptin, TNFα, toksin difterije, itd.).¹⁴⁵ AMT je drugi vezikularan mehanizam za unos većih kationskih molekula, peptida ili

proteina, koji su pozitivno nabijeni i reagiraju s negativno nabijenim fosfolipidima membrane čime se potiče endocitoza i transcitoza.¹⁵¹

Transportna barijera KMB-e temelji se na postojanju velikog broj različitih transportera u endotelnim stanicama moždanih kapilara koji u mozak prenose tvari esencijalne za održavanje integriteta moždanih stanica te funkcioniranje živčanog sustava i organizma (npr. glukozu, aminokiseline, nukleozide, itd.). Iako transporteri pokazuju izrazitu selektivnost prema određenom biološkom supstratu, oni mogu prenositi i druge molekule endogenog ili egzogenog porijekla.^{145,146} U transportere spadaju aktivni SLC transporteri (engl. *solute carriers*, SLCs) za čiju je funkciju potrebna energija te pasivni transporteri (tzv. nosači; engl. *carriers*). U SLC transportere se ubrajaju brojni transporteri organskog kationa (OCT) i transporteri organskog aniona (OAT). Osim transportera za unos tvari u SŽS, postoje i transporteri, tj. pumpe za izbacivanje molekula (engl. *efflux pumps*) širokog spektra iz SŽS-a, te u njih spadaju ABC transporteri (engl. *ATP-binding cassette*) koji posreduju izbacivanje molekula iz stanica uz utrošak ATP-a. Oni dodatno štite mozak od potencijalnih toksina, ali time predstavljaju dodatnu prepreku za održavanje farmakološki djelotvorne koncentracije lijeka u SŽS-u.



Slika 2.14. Lokalizacija transportnih pumpi iz skupine MRP, P-glikoproteina (P-gp) i BCRP te aktivnog transportera OAT na krvno-moždanoj barijeri. Slika preuzeta iz ref. 147 i prilagođena.

U ABC transportere spadaju proteini rezistencije na različite lijekove (MDR, od engl. *multi-drug resistance*) koji su dobili ime upravo po činjenici da neke stanice razviju rezistentnost prema nekom lijeku zbog toga što izbacivanjem smanjuju koncentraciju lijeka na ciljnom mjestu (npr. stanice karcinoma imaju povećanu ekspresiju MDR pumpi). Najznačajnije transportne pumpe su P-glikoprotein (P-gp) na apikalnoj strani endotelnih stanica KMB-e, protein rezistencije na karcinom dojke (BCRP, od engl. *breast-cancer related protein*) na luminalnoj strani endotelnih stanica KMB-e te nekoliko proteina povezanih s rezistencijom na

različite lijekove (MRP, od engl. *multidrug-resistance related protein*)^{145,147} koji se mogu nalaziti na abluminalnoj i/ili luminalnoj strani endotelnih stanica KMB-e (slika 2.14). Pumpe za izbacivanje iz SŽS-a obično prepoznaju molekule s hidrofobnim aromatskim i/ili tercijarnim amino skupinama, te je pokazano da P-gp supstrati obično imaju $\log P > 1,0$.^{146,149} P-gp ima daleko najznačajniju ulogu u zaštiti od ksenobiotika i endogenih metabolita te prenosi više od sto različitih, strukturno nepovezanih hidrofobnih amfifilnih molekula.^{145,147} Općenito, transportni proteini koje pronalazimo na KMB-i, nalaze se i u drugim tkivima kako je prikazano u tablici 2.9, gdje su navedeni i njihovi karakteristični supstrati.

Tablica 2.9. Lokalizacija u tijelu i supstrati nekih najbitnijih transportnih pumpi (P-gp, MRP, BCRP) i SLC aktivnih transportera (OCT2 i OATP1A2) krvno-moždane barijere.^a

Protein	Tkivo	Supstrati
P-gp	crijeva, mozak, srce, bubreg	razgranati neutralni ili kationski spojevi
MRP	ubikvitaran; jetra, bubreg, crijeva, mozak	negativno nabijeni amfifilni spojevi; analozi nukleotida
BCRP	jetra, crijeva, mozak	neutralni i anionski spojevi
OCT2	bubreg i mozak	organski kationi
OATP1A2	bubreg i mozak	različiti amfifilni supstrati

^aOCT2 (engl. *organic cation transporter 2*) i OATP1A2 (engl. *organic anion transporter family member 1A2*).

Metaboličku barijeru KMB-e predstavljaju različiti enzimi (CYP450, peptidaze, acetilkolinesteraza, alkalne fosfataza, γ -glutamil transferaza, monoamin oksidaza) koji se nalaze unutar stanica KMB-e i koji mogu metabolizirati endobiotike i ksenobiotike.^{147,149} Enzimi CYP450 sustava nalaze se unutar endotelnih stanica i u završnim nožicama astrocita.¹⁵⁰ Biotransformacijom lijek može izgubiti svoju farmakološku aktivnost, očuvati ju ili se prolijek može aktivirati. Također, unutar kiselog okruženja lizosoma (pH 4,5) mogu se razgraditi molekule unijete endocitozom. Primjerice, molekule koje sadrže amino skupinu se akumuliraju unutar lizosoma zbog protonacije dušika u kiselom mediju.

U mnogim patološkim stanjima dolazi do promjene permeabilnosti KMB-e. Ponekad se poremećaj funkcije barijere javlja i prije same neurološke patologije, odnosno to može biti uzrokom određenog poremećaja ili pak pogoršanja stanja.¹⁵⁰ S druge strane, mnoga patološka stanja SŽS-a uzrokuju poremećaj KMB-e (npr. multipla skleroza, hipoksija i ishemija, edem, Parkinsonova i Alzheimerova bolest, epilepsija, tumori, glaukom te lizosomske bolesti nakupljanja),¹⁴⁵ ali do toga mogu dovesti i neke patologije izvan SŽS-a (npr. HIV infekcija i dijabetes).^{145,150} Poremećaj KMB-e može biti prolazan ili dugotrajan. Također, kod nekih bolesti dolazi do promjene u ekspresiji transportera i enzima.¹⁴⁵ Dodatno, pokazano je da uslijed epileptičkih napadaja induciranih somanom dolazi do povećanja permeabilnosti

KMB-e, kao i nakon otrovanja sarinom gdje je povećana permeabilnost u području moždanog debla, srednjeg mozga, malog mozga te velikog mozga ovisna o primijenjenoj dozi sarina.¹⁵²

2.4.2. *Pristupi u dizajnu lijekova s djelovanjem u središnjem živčanom sustavu*

Dosadašnja istraživanja trovanja OP spojevima i postojeće terapije u medicinskoj praksi ukazalo je na potrebu pronalaska reaktivatora inhibirane AChE koji posjeduju bolje farmakokinetičke karakteristike od onih koji se trenutno koriste u medicinskoj praksi, tj. reaktivatore koji bi imali djelovanje na AChE u SŽS-u. AChE u mozgu se nalazi vezana za membranu neurona u sinapsama ispunjenim intersticijskom tekućinom, te je to ciljno mjesto za dostavu reaktivatora. Stoga bi reaktivatori koji pokazuju farmakološko djelovanje u SŽS-u trebali imati fizikalno-kemijske karakteristike koje omogućavaju veću brzinu pasivnog transporta kroz KMB-u ili pak strukturu koja će biti prepoznata jednim od mogućih aktivnih transportnih sustava za unos u SŽS. Osim dostave oksima u SŽS, potrebno je osigurati dovoljnu koncentraciju tog lijeka i u sinapsama perifernog živčanog sustava, a prethodno je obrazloženo da distribucija i biodostupnost lijeka ovisi i o načinu primjene lijeka, kao i o njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Obzirom da okolnosti u kojima bi protuotrov za trovanje OP spojevima najčešće trebao biti primijenjen ne podrazumijevaju dostupnost stručne medicinske skrbi, njihova primjena je ograničena na *i.m.* primjenu (autoinjektori) ili eventualnu oralnu primjenu.

Općenito, za prolazak molekule pasivnim transportom kroz KMB-u, bitna su njezina fizikalno-kemijska svojstva koje govore o njenoj veličini, lipofilnosti, polarnosti te fleksibilnosti. Analizom lijekova koji pokazuju učinak u SŽS-u definirane su granične vrijednosti tih fizikalno-kemijskih svojstava. Opća karakteristika lijeka s djelovanjem u SŽS-u je veća lipofilnost u odnosu na lijekove koji ne prolaze kroz KMB-u i ona je preduvjet za pasivni prijenos molekule kroz barijeru. S druge strane, lipofilnost lijekova općenito treba biti umjerena ($\log P < 5$) kako bi se izbjegle nuspojave lijeka. Također, kako bi molekula prešla kroz biološku barijeru ona mora „reagirati“ s polarnim „glavama“ fosfolipida membrane. Pokazano je da se u SŽS pasivnim transportom prenose manje polarne molekule od onih koje ne prolaze kroz KMB-u, točnije, zbog povećanja mogućnosti stvaranja vodikovih veza između molekule lijeka i fosfolipida membrane smanjuje se mogućnost penetracije te molekule kroz KMB-u. Mogućnost stvaranja vodikovih veza očituje se u ukupnoj polarnosti molekule, tj. u broju heteroatoma u strukturi molekule (pr. dušik, kisik), odnosno u broju donora i akceptora vodikovih veza (HBD i HBA od engl. *hydrogen-bond donors/acceptors*) te u području polarne površine (PSA od engl.

polar surface area) koja proizlazi iz površine tih heteroatoma. Temeljem analize PSA molekula kojima je ispitan potencijal penetracije preko barijere Caco-2 stanične linije, uočeno je da su molekule s $PSA \leq 60 \text{ \AA}$ bile potpuno apsorbirane, dok molekule s $PSA \geq 140 \text{ \AA}$ nisu uopće. Također je pokazano da lijekovi koji pokazuju djelovanje u SŽS-u i prisutni su na tržištu, imaju vrijednost PSA manju od 90 \AA . *In silico* se obično određuje TPSA (*topological PSA*) temeljem dvodimenzionalne strukture molekule.¹⁵³ Osim toga, kako bi molekula prošla kroz membranu, ona mora imati i određenu fleksibilnost koja se ogledava u broju veza unutar molekule koje se mogu rotirati (RB; engl. *rotatable bonds*) i govori o lakoći kojom molekula prolazi kroz membranu. Međutim, prevelika fleksibilnost, odnosno mogućnost brojnih konformacijskih stanja, također ograničava uspješan prolaz molekule na drugu stranu membrane. Pokazano je da molekule s $RB > 10$ imaju smanjenu biodostupnost nakon oralne primjene, vjerojatno zbog otežanog prolaska (apsorpcije) kroz intestinalnu barijeru. Također, pokazano je da većina lijekova aktivnih u SŽS-u imaju $RB \leq 5$.¹⁵³ Također, bitan je i ukupan volumen molekule te njezina molarna masa (M) čije vrijednosti trebaju biti manje nego kod lijekova koji nemaju djelovanje u SŽS-u.¹⁵³ Većina lijekova s djelovanjem u SŽS-u je, prema funkcionalnim skupinama u strukturi, bazičnog ili amfifilnog karaktera te pri fiziološkom pH istovremeno daju nabijene i nenabijene molekulske vrste. Nenabijene molekulske brže prolaze kroz membranu, iako je pokazano da postojanje pozitivnog naboja pri pH 7 – 8 također omogućava penetraciju u SŽS, jer mnogo lijekova koji pokazuju djelovanje u SŽS-u ima tercijarni dušikov atom. Nasuprot tome, slabe organske kiseline (npr. molekule s karboksilnom skupinom) uglavnom ne prolaze u SŽS. Na kraju, kako bi se što veće koncentracije spoja postigle na ciljnom mjestu djelovanja u SŽS-u, bitno je da metabolizam te molekule i njezino vezanje na proteine plazme i tkiva bude što manje, kao i da molekula nije supstrat pumpama za izbacivanje spojeva iz SŽS-a. Također je bitno da djelotvorne koncentracije lijeka budu što niže kako bi on iskazao svoj farmakološki učinak u SŽS-u, gdje se mogu očekivati manje koncentracije lijeka od koncentracija u cirkulaciji. S druge strane, ako su za djelovanje *in vivo* potrebne veće doze lijeka, onda je bitno da taj lijek što manje reagira s makromolekulama koje nisu farmakološka meta, tj. da što manje dolazi do nespecifičnih interakcija (pr. inhibicija ili indukcija metaboličkih enzima i dr.). U **tablici 2.10** sumirane su poželjne vrijednosti i karakteristike lijekova s djelovanjem u SŽS-u.

Tablica 2.10. Preporuke za vrijednosti odabranih svojstava molekule koji ima potencijal da bude lijek s djelovanjem u središnjem živčanom sustavu.¹⁵³

Svojstvo molekule	Preporučene vrijednosti/svojstva
Djelotvorne koncentracije	Niske do subnanomolarne
Selektivnost za farmakološku metu	Visoka
Molarna masa (M)	< 450
Lipofilnost (logP)	< 5
Broj donora vodikovih veze (HBD)	< 3
Broj akceptora vodikovih veze (HBA)	< 7
Broj veza koje se rotiraju (RB)	< 8
Vodikove veze	< 8
pK_a	Između 7,5 – 10 (neutralni i bazični spojevi)
Područje polarne površine (PSA)	< 60 – 70 Å
Metabolička stabilnost	> 80% spoja preostalo nakon 1h
Inhibicija CYP450	< 50% pri 30 μmol dm ⁻³
Supstrat za P-gp pumpu	Ne
Vežanje na serumski albumin	K _d < 10 μmol dm ⁻³
Topljivost u vodi	> 60 μg mL ⁻¹
Efektivna permeabilnost	> 1 · 10 ⁻⁶ cm s ⁻¹

Ukoliko sam lijek nije moguće optimizirati za pasivni-transport kroz KMB-u, mogu se dizajnirati i sintetizirati prolijekovi koji su lipofilniji od ishodnih spojeva i u većoj mjeri prolaze kroz KMB-u.¹⁴⁶ Prolijekovi se po dolasku na mjesto djelovanja kemijski ili enzimski biotransformiraju u farmakološki aktivnu tvar. Modifikacije lijekova u prolijekove uključuju esterifikacije i amidacije karboksilne kiseline, acetilacije aminske ili alkoholne skupine fosforilacije alkoholne skupine, ciklizacija peptida itd., dok se enzimi koji su zaduženi za biotransformaciju prolijekova u lijekove ubrajaju u fosfataze, esteraze, amidaze, itd.¹⁵⁴ Osim toga, dizajn lijekova se može usmjeriti i na modifikaciju strukture koja bi bila prepoznata kao supstrat za određene aktivne SLC transportere koji su eksprimirani na luminalnoj strani endotelnih stanica KMB-e.¹⁴⁶ Neki su iznimno stereoselektivni za endogene supstrate (pr. GLUT1, nukleozidni transporteri), dok najširi spektar supstrata prepoznaje L-sustav SLC transportera (LAT; engl. *large neutral amino acid carrier*) koji prepoznaje strukturu α-aminokiseline (α-ugljikov atom s amino i karboksilnom skupinom) s razgranatim bočnim lancem (pr. L-DOPA koristi taj transport te ulazi u SŽS unatoč kompeticiji s endogenim supstratima).¹⁴⁶ Također, potencijalni lijek može biti ligand onih receptora kojima se potiče transcitozni prijenos preko barijere (RMT) ili do transcitoze može doći uslijed adsorpcije kationske molekule preko interakcije njezinog pozitivnog naboja i negativnih naboja fosfolipida membrane (AMT).¹⁴⁹ Ukoliko je smanjena koncentracija lijeka u SŽS-u posljedica rezistencije zbog izbacivanja lijeka transportnim pumpama iz mozga natrag u krv, moguća strategija za izbjegavanje toga jest inhibicija transportnih pumpi ili dizajn analognih lijekova koji nisu njihovi supstrati.¹⁴⁶ U liposome i nanočestice, koji na svojoj površini imaju ligande

koje prepoznaju receptori na KMB-i, se može uklopiti veći broj molekula lijeka i oni se mogu transcitozno prenijeti u mozak.¹⁴⁶ Neki od najčešćih liganada koji se vežu na površinu nanočestica su apolipoprotein, liganad transferinskih receptora ili antitijela za inzulinski receptor.¹⁵⁴ U literaturi se spominje i mogućnost indukcije poremećaja integriteta KMB-e kako bi se omogućio paracelularni prolaz lijeka u SŽS (pr. hipertonična otopina koja uzrokuje skupljanje stanica, farmakološke modifikacije proteina u čvrstim spojevima između stanica, povećanje permeabilnosti ultrazvučnim ili elektromagnetskim zračenjem, itd.), ali takav pristup je poprilično neselektivan i zbog toga nepovoljan. Osim navedenih metoda za dostavu lijeka u SŽS, postoje i druge direktne ili indirektne metode s obzirom na način primjene lijeka. Jedan od primjera je intranazalna primjena kojom se lijekovi mogu dostaviti u SŽS zbog postojanja olfaktornih (njušnih) neurona povezanih sa SŽS-om u intranazalnoj šupljini (pr. tako primjenjivanih lijekova su sulfonamidi, cefaleksin, progesteron, zidovudin, inzulin, hijaluronidaza).¹⁴⁶ Postoje i nešto invazivnije eksperimentalne metode mehaničke dostave (pr. intracerebralna primjena),¹⁴⁶ međutim one nisu opcija za primjenu antidota pri trovanju OP spojevima.

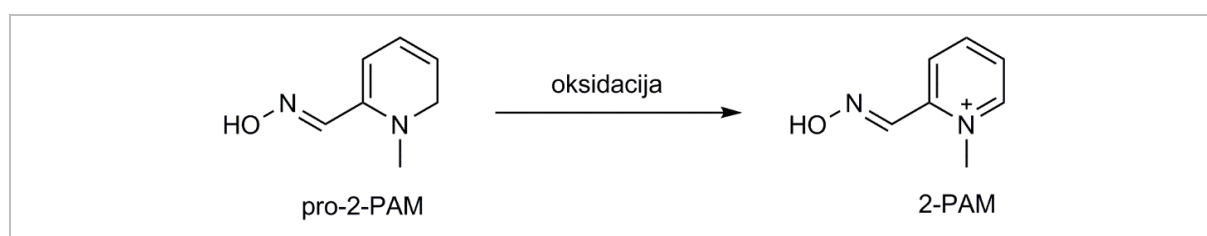
2.4.3. Novije generacije reaktivatora s djelovanjem u središnjem živčanom sustavu

Dosadašnji naponi u dizajnu novih reaktora koji bi prolazili u SŽS u većoj mjeri jesu sinteza nenabijenih oksima koji nemaju kvaterni već tercijarni dušikov atom u piridinskom prstenu, prolijekova oksima, glikoziliranih oksima te uklapanje oksima u nanočestice, kao i povećanje lipofilnosti molekula reaktivatora različitim supstituentima. Stare generacije tercijarnih nenabijenih oksima, u koje spadaju oksimi MINA i DAM prikazani na **slici 2.15**, prolaze kroz KMB-u i pokazali su veće preživljenje zamoraca kod kojih su izazvani napadaji uslijed izlaganja sarinu (potentniji oksim je MINA),^{155,156} ali imaju puno slabiji reaktivacijski učinak od oksima 2-PAM.^{38,41}



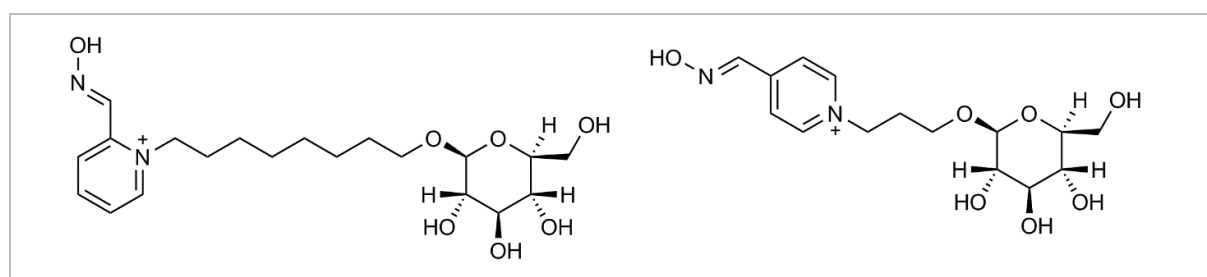
Slika 2.15. Tercijarni nenabijeni oksimi s ketoaldoksimskom ili ketoksimskom skupinom.

Sintetiziran je i prolijek oksima 2-PAM, pro-2-PAM (**slika 2.16**), koji je zbog drugačijeg elektronskog stanja lipofilniji i prolazi kroz KMB-u, a u mozgu brzo oksidira u 2-PAM ($t_{1/2} = 1$ min).¹⁵⁷ Kod ispitivanja učinka oksima pro-2-PAM na zamorcima uočen je slab potencijal reaktivacije AChE inhibirane sarinom i VX-om u krvi, mozgu i perifernim tkivima. U slučaju izlaganja ciklosarinu uočena je tek ograničena reaktivacija AChE u krvi, srcu i leđnoj moždini, a napadaju nisu bili spriječeni. Također, pro-2-PAM pružio je nisku zaštitu kod trovanja somanom. S druge strane, pro-2-PAM se pokazao učinkovitim kod supresije napadaja induciranih DFP-om u zamoraca čime je smanjeno i neurološko oštećenje te je spriječena pojava simptoma trovanja u miševa izloženim DFP-u i sarinu. Međutim, pro-2-PAM pruža tek ograničenu zaštitu SŽS-a kod trovanja OP spojevima.¹⁴⁴



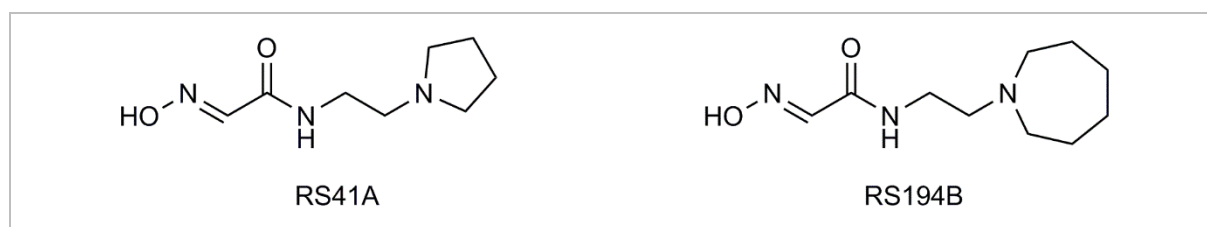
Slika 2.16. Oksim pro-2-PAM *in vivo* oksidira u 2-PAM.¹⁵⁷

Glikozilirani oksimi (**slika 2.17**) sintetizirani su pod pretpostavkom da će biti preneseni kroz KMB-u koristeći transportere za glukozu, GLUT1, po uzoru na neke glukozne konjugate lijekova koji su pokazali farmakološku učinkovitost u SŽS-u u usporedbi s ishodnim molekulama. *In vivo* eksperimenti gdje je ispitana akutna toksičnost odabranih glikoziliranih oksima pokazano je da imaju značajno manju toksičnost od oksima 2-PAM nakon *i.m.* primjene, a ostalim testovima toksičnosti pokazano je da je uslijed primjene glikoziliranih oksima morfologija neurona očuvana, te da nije bilo degeneracije neurona.¹⁵⁸ Međutim, *in vitro* analiza nekoliko sintetiziranih oksima pokazala je nisku učinkovitost u reaktivaciji ljudske AChE inhibirane s DFP-om i paraoksonom te reaktivaciju usporedivu s 2-PAM-om za VX i sarin.



Slika 2.17. Primjeri glikoziliranih oksima.¹⁵⁹

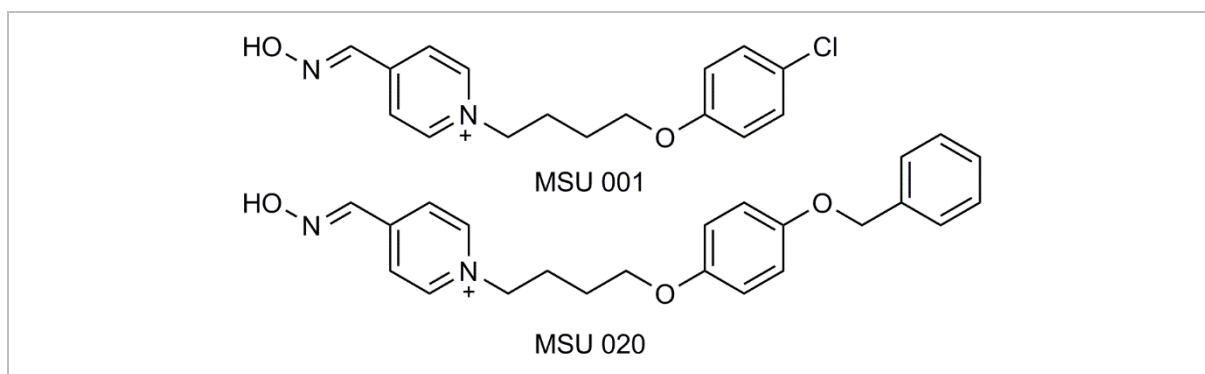
Wagner i suradnici su ispitali transport oksima uklopljenih u nanočestice kroz *in vitro* model barijere.¹⁶⁰ Oksimi obidoksim diklorid i HI-6 (diklorid monohidrat i dimetansulfonat) uklopljeni su u nanočestice napravljene od albumina iz ljudskog seruma s adsorbiranim ili kovalentno vezanim apolipoproteinom E (ApoE) koji bi služio za transcitozni prijenos preko KMB-e potaknut receptorom za ApoE. Pokazano je da navedene nanočestice s oksimima nemaju citotoksičan učinak u izoliranim primarnim staničnim kulturama endotelnih stanica kapilara mozga svinje. Također, u primarnim kulturama je utvrđeno je da nanočestice prelaze model barijere u većoj mjeri od slobodnih oksima te je pomoću fluorescentnih obilježivača pokazan značajan unos nanočestica s oksimom u citosol stanica linije endotelioma mišjeg mozga.



Slika 2.18. Nenabijeni N-supstituirani 2-hidroksiminoacetamidni reaktivatori.⁴¹

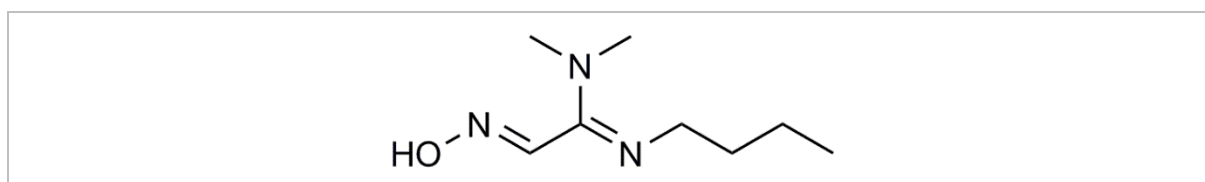
Nadalje, sintetizirana je nova serija oksimskih reaktivatora, N-supstituirani 2-hidroksiminoacetamidni alkilamini s tercijskom aminskom ili imidazolnom protonirajućom funkcionalnom skupinom, čija pK_a vrijednost (7 – 10) omogućava ravnotežu između kationskih, neutralnih te zwitterionskih i anionskih vrsta pri fiziološkom pH 7,4.³⁸ Smatra se da bi pritom neutralne i zwitterionske vrste oksima mogle prolaziti kroz KMB-u u većoj mjeri nego standardni oksimi, te bi se u SŽS-u ponovno uspostavila kiselo-bazna ravnoteža između različitih molekulskih vrsta. U ovoj seriji oksima se RS41A (**slika 2.18**) pokazao vodećim reaktivatorom temeljem *in vitro* reaktivacije AChE inhibirane OP spojevima te je njegova reaktivacijska učinkovitost usporediva s oksimom 2-PAM. Strukturni analog RS41A oksima, RS194B oksim (**slika 2.18**), pokazuje dobru učinkovitost u reaktivaciji AChE inhibirane OP spojevima, a kao glavni razlog tome naveden je povećan afinitet inhibiranog enzima prema oksimu.⁴⁰ Također, RS194B pokazao je nisku akutnu toksičnost ($LD_{50} > 500$ mg/kg) nakon *i.m.* primjene (doza 80 mg kg⁻¹) u miševa, a za oba oksima RS41A i RS194B utvrđeno je da ostvaruju koncentraciju u mozgu koja je jednaka 12 – 30 % koncentracije u krvi.³⁹ Miš tretiran s OP spojem pokazao je bolji oporavak nakon tretmana s RS194B nego nakon primjene oksima RS41B ili 2-PAM.³⁹ Također,

RS194B se pokazao učinkovitim i u *in vivo* pokusima na rezus majmunima (*Macaca mulatta*) izloženim sarinu i paraoksonu.^{161,162}



Slika 2.19. Vodeći fenoksialkil piridinijevi oksimi.⁵¹

Sintetizirani su i oksimi nalik detergentima, fenoksialkil piridinijevi oksimi (**slika 2.19**) kod kojih je na piridinijev prsten s kvaternim dušikovim atomom vezan lipofilni suspstituent.⁵¹ Ti oksimi su učinkovito reaktivirali AChE inhibirane analogizma sarina i VX-a *in vitro*, ali manje učinkovito od oksima 2-PAM. Međutim, za razliku od oksima 2-PAM, fenoksialkil piridinijevi oksimi su pokazali sposobnost *in vivo* reaktivacije AChE u mozgu štakora izloženih subletalnim dozama analoga sarina i VX-a čime je potvrđeno da prolaze u mozak.

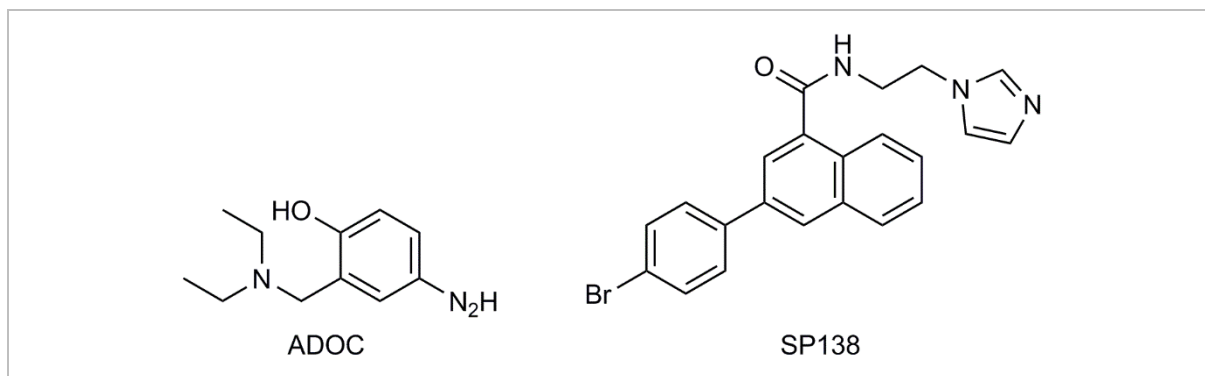


Slika 2.20. Vodeći amidin-oksimski reaktivator N-[2-(butyliminoil)-2-(dimetilamin)etiliden]hidroksilamin.¹⁶³

Nova klasa oksima, koji nemaju klasičnu piridinijevu strukturu, su amidinski oksimi koji također formiraju zwitterione pri fiziološkom pH, a nukleofilni potencijal proizlazi iz njihove amidinske skupine.¹⁶³ Za vodeći amidinski oksim, N-[2-(butyliminoil)-2-(dimetilamin)etiliden]hidroksilamin (**slika 2.20**), pokazano je da prolazi kroz KMB-u. Također, isti oksim se pokazao metabolički stabilnim te nije pokazao sposobnost inhibicije CYP450 enzima, a nije uočena niti citotoksičnost na stanicama sisavaca, kao ni prividna toksičnost ili promjene u ponašanju *in vivo* u dozama do 200 mg kg⁻¹.

Katz i suradnici pokazali su da molekule bez oksimske skupine posjeduju reaktivacijski učinak za AChE inhibiranu paraoksonom i DFP-om te analogizma sarina i somana.³⁷ Strukturno, ovi spojevi spadaju u Mannichove fenole (vodeći reaktivator je ADOC, 4-amino-2-

(dietilaminometil)fenol) ili analoge klorokina (pr. analog klorokina s imidazolnim prstenom, SP138) (slika 2.21) te se pretpostavlja da je reaktivacija rezultat nukleofilne supstitucije ili bazne katalize. Dva spomenuta vodeća neoksimski spoja ispitani su u *in vivo* eksperimentima na miševima izloženim letalnim dozama OP spojeva te su novi spojevi pokazali učinkovitiju reaktivaciju AChE u mozgu i značajnije preživljenje životinja tijekom 24 sata u usporedbi s oksimom 2-PAM.³⁷



Slika 2.21. Vodeći neoksimski reaktivatori: ADOC iz skupine Mannichovih fenola kao analog antimalarika amodiakina te spoj SP138 kao analog klorokina.³⁷

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Oksimi

U ovoj doktorskoj radnji testirane su dvije novosintetizirane skupine oksima, hidroksipiridinski oksimi (**tablica 3.1**) i klorpiridinijevi oksimi (**tablica 3.2**).

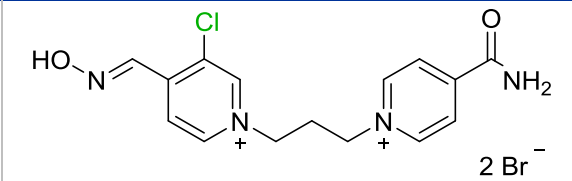
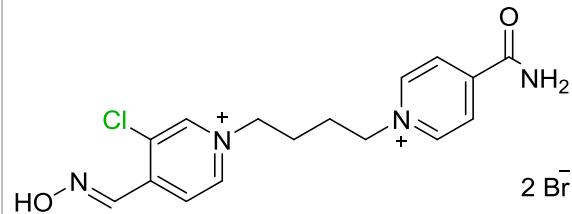
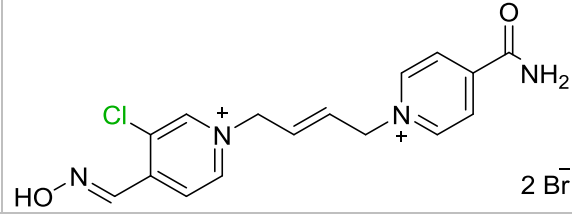
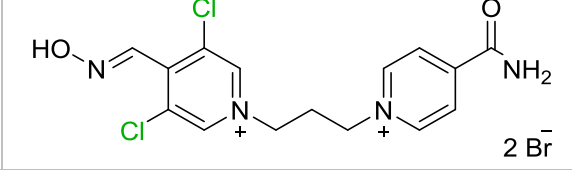
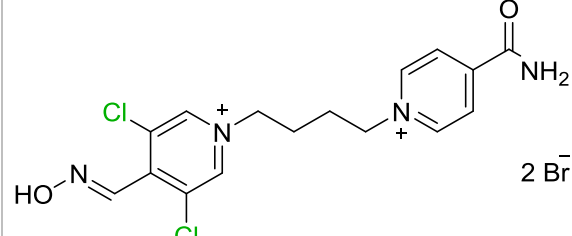
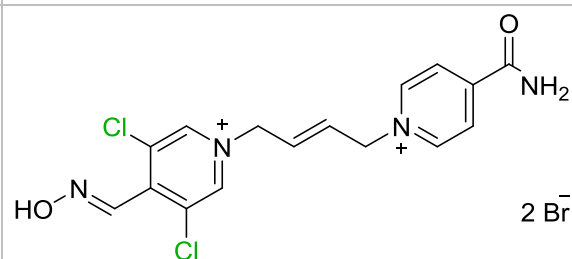
Tablica 3.1. Hidroksipiridinski oksimi.

Oksim	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-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-2-il)pentil]-2-[(hidroksimino)metil]piridin-3-ol
GM508		6-(5-{1-[4-(dimetilamino)fenil]-6,7-dimetoksi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-2-il}pentil)-2-[(hidroksiimino)metil]piridin-3-ol

Hidroksipiridinski oksimi, preciznije 3-hidroksi-2-piridinski oksimi, sintetizirani su na *Normandie Université*, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA (UMR 6014), Rouen, Francuska i njihova sinteza je objavljena u publikaciji.¹⁰² Izvorne otopine oksima JR585, JR595, RM048 i GM508 koncentracije 100 mmol dm⁻³ pripremljene su u čistom dimetil sulfoksidu (DMSO; *Kemika*, Zagreb, Hrvatska), dok je ishodna otopina oksima GM415

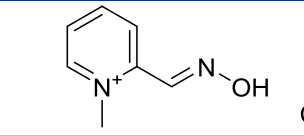
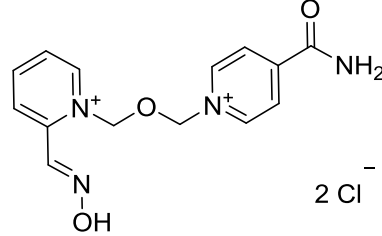
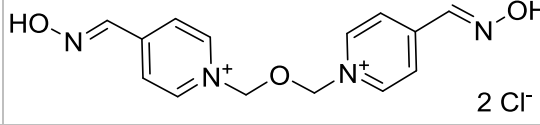
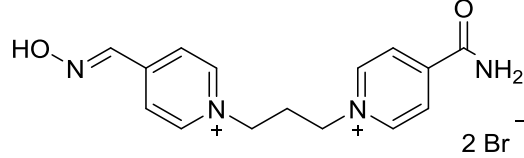
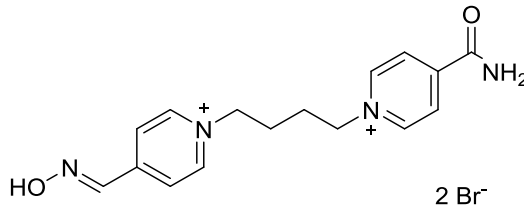
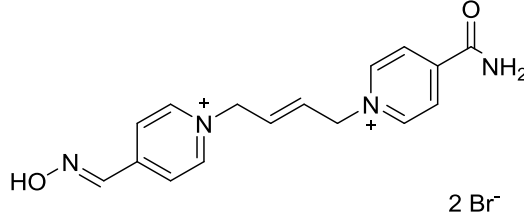
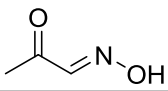
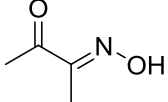
(50 mmol dm⁻³) pripremljena u čistom metanolu (*Kemika, Zagreb, Hrvatska*) i otopine su čuvane na 4 °C. Daljnja razrjeđenja (1 – 2 mmol dm⁻³) pripremljena su u vodi ili 0,1 mol dm⁻³ fosfatnom puferu, izuzev oksima GM508 čija je topljivost u vodi ili puferu bila u rasponu od 100 – 300 μmol dm⁻³. Oksim JR595 dodatno je sintetiziran kao sol trifluorooctene kiseline (JR595 x 1,5 TFA) kako bi se poboljšala njegova topljivost u vodi (100 mmol dm⁻³).

Tablica 3.2. 3-klorpiridinijevi (K865, K866, K867) i 3,5-diklorpiridinijevi (K868, K869, K870) oksimi.

Oksim	Struktura	IUPAC kemijsko ime spoja
K865		4-karbamoil-1-(3-{3-klor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}propil)piridinijev dibromid
K866		4-karbamoil-1-(4-{3-klor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}butil)piridinijev dibromid
K867		4-karbamoil-1-[4-{3-klor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}but-2-enil]piridinijev dibromid
K868		4-karbamoil-1-(3-{3,5-diklor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}propil)piridinijev dibromid
K869		4-karbamoil-1-(4-{3,5-diklor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}butil)piridinijev dibromid
K870		4-karbamoil-1-[4-{3,5-diklor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}but-2-enil]piridinijev dibromid

Oksimi s jednim ili dva atoma klora vezanih na jedan piridinijev prsten bispiridinijevih oksima su sintetizirani u *Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Králové*, Hradec Králové, Češka Republika. Izvorne otopine oksima (10 ili 100 mmol dm⁻³) priređene su u destiliranoj vodi i čuvane pri 4 °C, dok su daljnja razrjeđenja oksima u vodi pripravljena neposredno prije pokusa.

Tablica 3.3. Piridinijevi oksimi 2-PAM, HI-6, obidoksim, K027, K048 i K203 te tercijarni oksimi MINA i DAM.

Oksim	Struktura	IUPAC kemijsko ime spoja
2-PAM		2-[(hidroksiimino)metil]-1-metilpiridinijev klorid
HI-6		4-karbamoil-1-[(2-[(hidroksiimino)metil]piridinio)metoksi]metilpiridinijev diklorid monohidrat
Obidoksim		4-[(hidroksiimino)metil]-1-[(4-[(hidroksiimino)metil]piridinio)metoksi]metilpiridinijev diklorid
K027		4-karbamoil-1-(3-{4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}propil)piridinijev dibromid
K048		4-karbamoil-1-(4-{4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}butil)piridinijev dibromid
K203		4-karbamoil-1-(4-{4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}but-2-enil)piridinijev dibromid
MINA		1-(hidroksiimino)propan-2-on
DAM		3-(hidroksiimino)butan-2-on

Osim navedenih novih skupina oksima, u nekim analizama su za usporedbu korišteni i oksimi prikazani u **tablici 3.3**. Oksimi 2-PAM, HI-6, obidoksim, K027, K048 i K203 su sintetizirani u *Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Králové, Češka Republika*. Oksimi MINA i DAM kupljeni su od *Sigma-Aldrich, SAD*. Izvorne otopine ovih oksima (10 ili 100 mmol dm⁻³) priređene su u destiliranoj vodi i čuvane pri 4 °C.

3.2. Spektrofotometrijska i kinetička mjerenja

3.2.1. Kemikalije i enzimi

U kinetičkim istraživanjima je korišten 0,1 mol dm⁻³ natrijev fosfatni pufer pripremljen titracijom 0,1 mol dm⁻³ otopina soli Na₂HPO₄ i NaH₂PO₄ do pH 7,4 pri temperaturi 25 °C. Pritom je korišten pH-metar SevenEasy pH s InLab® Expert Pro elektrodom (*Mettler-Toledo GmbH, Švicarska*) baždaren standardnim otopinama pufera pH 4,01 ± 0,02, pH 7,00 ± 0,02 i pH 9,21 ± 0,02 (*Mettler-Toledo GmbH, Švicarska*). Acetiltiokolin jodid (ATCh; *Sigma-Aldrich, SAD*) korišten je kao supstrat kolinesteraza, te su ishodne otopine supstrata (10 ili 20 mmol dm⁻³) i dodatna razrjeđenja pripremljene otapanjem u destiliranoj vodi neposredno prije pokusa. Reagens u Ellmanovoj metodi, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB) (*Sigma-Aldrich, SAD*), priređen je kao 6 ili 10 mmol dm⁻³ otopina u fosfatnom puferu koja je čuvana pri 4 °C. Izvorna otopina albumina goveđeg seruma (BSA; *Sigma-Aldrich, SAD*) pripremljen je kao 1 %-tna otopina u 0,1 mol dm⁻³ natrijevom fosfatnom puferu. Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

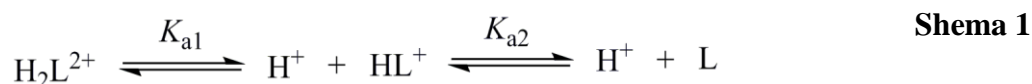
U pokusima enzimske kinetike je korištena ljudska rekombinantna AChE i ljudska BChE dobivena iz ljudske plazme, koje je darovao dr. sc. Florian Nachon, *Département de Toxicologie et Risques Chimiques, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge, Francuska*. Izvorne otopine enzima (20 puta razrijeđene) pripravljene su u 1 %-tnoj otopini BSA, a daljnja razrjeđenja pripremana su neposredno prije pokusa u 0,1 %-tnoj otopini BSA u fosfatnom puferu. Finalna razrjeđenja enzima koja pri 1 mmol dm⁻³ supstratu ATCh rezultiraju s enzimskom aktivnošću ΔA/min oko 0,1 iznose oko 20 000 puta za hAChE i 40 000 puta za hBChE.

Korišteni su OP spojevi sarin (izopropil-metilfosfonofluoridat), ciklosarin (O-cikloheksil-metilfosfonofluoridat), VX (S-2-diizopropilaminoetil-O-etil-metilfosfonotioat)

i tabun (etil-dimetilaminocijanofosfonat) kupljeni od *NC Laboratory*, Švicarska, dok je paraokson-etil (dietil-4-nitrofenil-fosfat) kupljen od *Sigma-Aldrich*, SAD. Izvorne otopine sarina, VX-a, ciklosarina i tabuna ($5000 \mu\text{g mL}^{-1}$) pripremljene u izopropilnom alkoholu, dok je izvorna otopina paraoksona ($2750 \mu\text{g mL}^{-1}$) pripremana je u 96 %-tnom etanolu, a sve su čuvane na $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Daljnja razrjeđenja su pripremana u destiliranoj vodi, odnosno u etanolu u slučaju paraoksona, neposredno prije pokusa. Svi navedeni spojevi bili su analitičke čistoće.

3.2.2. Određivanje pK_a vrijednosti oksimske skupine

Zbog $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronskih prijelaza unutar prstena piridina javlja se karakteristični signal (maksimum) apsorpcijskog spektra na valnoj duljini unutar raspona 344 – 370 nm. Porast intenzitet apsorpcije na navedenoj karakterističnoj valnoj duljini korelira s porastom koncentracije deprotoniranog oblika skupina vezanih na prsten piridina, najčešće oksimske skupine kao u slučaju klorpiridinijevih oksima, dok hidroksipiridinski oksimi imaju dvije protonirajuće skupine, oksimsku i hidroksilnu. Mjerenjem apsorpcijskih spektara (220 – 450 nm) u otopinama različitih pH vrijednosti (4,4 – 11,3), koje su pripremljene miješanjem različitih omjera $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopina soli Na_2HPO_4 i NaH_2PO_4 , određene su konstante kiselobazne ravnoteže, K_a . Otopine lužnatog pH ($> 9,35$) pripremljene su dodatkom $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH. Spektri su mjereni pomoću spektrofotometra CARY 300 (*Varian Inc.*, Australia) pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ u kvarcnim kivetama (QS) s optičkim putem od 1 cm. Iz snimljenih spektara dobiveni su grafovi ovisnosti apsorpcije pri karakterističnim maksimumima spektra o koncentraciji vodikovih iona. Kiselo-bazna ravnoteža može se opisati **shemom 1**, u kojoj je diprotonirani oblik oksima označen s H_2L^{2+} , monoprotionirani oblik oksima s HL^+ i neprotonirani oblik oksima s L. U slučaju kada oksim ima samo jednu protonirajuću skupinu vezanu na prsten piridina (pr. klorpiridinijevi oksimi), kiselo-bazna ravnoteža opisana je samo drugim korakom Sheme 1:



Primjenom jednadžbi (1) i (2) za nelinearnu regresiju izračunate su konstante kiselobazne ravnoteže K_{a1} , odnosno K_{a1} i K_{a2} :

$$A_{\text{tot}} = \frac{A_2 \cdot [\text{H}^+] + A_3 \cdot K_{a1}}{[\text{H}^+] + K_{a1}} \quad (1)$$

$$A_{\text{tot}} = \frac{A_1 \cdot [\text{H}^+]^2 + A_2 \cdot [\text{H}^+] \cdot K_{a1} + A_3 \cdot K_{a1} \cdot K_{a2}}{[\text{H}^+]^2 + [\text{H}^+] \cdot K_{a1} + K_{a1} \cdot K_{a2}} \quad (2)$$

gdje je A_{tot} , apsorbancija pri određenoj valnoj duljini maksimuma spektra jednaka sumi apsorbancijskih udjela svih prisutnih ionizacijskih oblika oksima. Apsorbancije A_1 , A_2 , A_3 su apsorbancije, kako slijedi, diprotoniranog oblika (H_2L^{2+}), monoprotioniranog oblika (HL^+) i neprotoniranog oblika (L). Koncentracija vodikovih iona u otopini označena je s $[\text{H}^+]$. Primjenom jednadžbe (3) pomoću programa *Prism6* (*GraphPad Software*, San Diego, SAD) određene su $\text{p}K_a$ vrijednosti te je primjenom Henderson-Hasselbalchove jednadžbe (4) izračunat udio oksima s deprotoniranom oksimskom skupinom pri pH 7,4:

$$\text{p}K_a = -\log K_a \quad (3)$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (4)$$

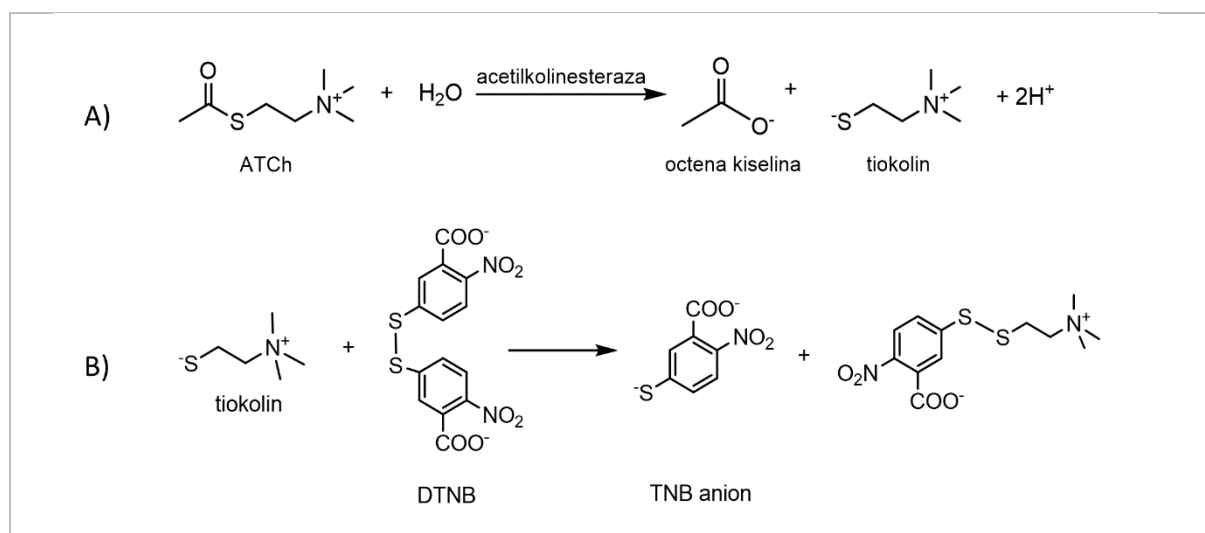
gdje $[\text{A}^-]$ predstavlja koncentraciju oksima s deprotoniranom oksimskom skupinom, a $[\text{HA}]$ koncentraciju oksima s protoniranom oksimskom skupinom koja odgovara jednakosti ($1 - [\text{A}^-]$).

3.2.3. Određivanje aktivnosti kolinesteraza metodom po Ellmanu

Aktivnost kolinesteraza praćena je spektrofotometrijski indirektnom metodom po Ellmanu pri 25 °C uz supstrat ATCh i DTNB kao tiolni reagens.¹⁶⁴ Enzimskom hidrolizom ATCh supstrata nastaje tiokolin (TCh) koji reagira s DTNB reagensom pri čemu nastaje anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB^-) koji daje žuto obojenje reakcijskoj smjesi (**slika 3.1**). Porast apsorbancije TNB^- aniona u vremenu prati se pri valnoj duljini od 412 nm te je proporcionalan aktivnosti enzima koja slijedi Lambert-Beerovu zakonitost (5):

$$v = \frac{\Delta A / \text{min} \cdot R}{\varepsilon \cdot d} \quad (5)$$

gdje $\Delta A/\text{min}$ predstavlja porast apsorbancije u jedinici vremena, v aktivnost enzima, R je konačno razrjeđenje enzima, ε je molarni ekstinkcijski koeficijent za TNB^- anion, a d predstavlja duljinu optičkog puta. Za mjerenje enzimske aktivnosti pri valnoj duljini 412 nm molarni ekstinkcijski koeficijent iznosi $14\,150\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.¹⁶⁵

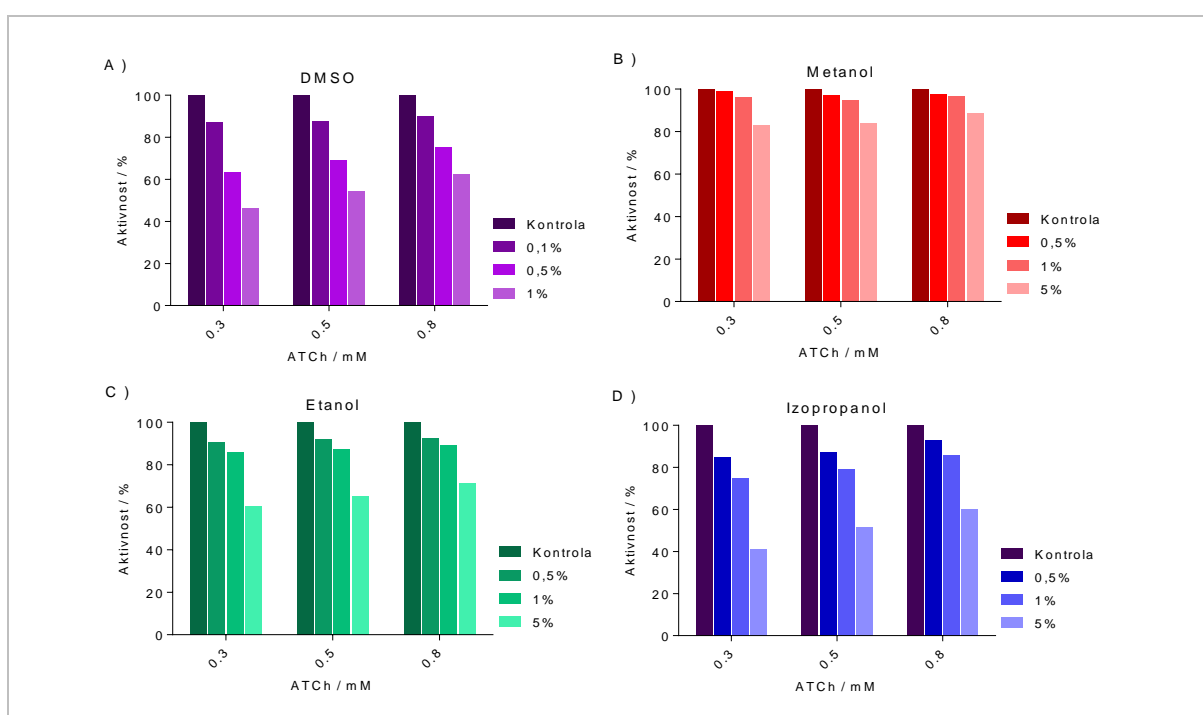


Slika 3.1. Ellmanova metoda: A) enzimskom hidrolizom acetiltiokolina (ATCh) oslobađa se tiokolin, B) tiokolin potom reagira s DTNB reagensom, pri čemu se oslobađa žuto obojeni anion TNB^- .¹⁶⁴

Reakcijska smjesa za određivanje enzimske aktivnosti sadržavala je $30\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ DTNB, fosfatni pufer te enzim u finalnom razrjeđenju koje u mjerenju pokazuje promjenu apsorbancije u vremenu ($\Delta A/\text{min}$) od oko 0,1 pri $1,0\ \text{mmol dm}^{-3}$ koncentraciji supstrata ATCh ($25\ ^\circ\text{C}$, pH 7,4). Mjerenje enzimske aktivnosti započeto je dodatkom supstrata ATCh u reakcijsku smjesu i trajalo je od dvije do četiri minute. Prilikom mjerenja aktivnosti svih uzoraka, promjena apsorbancije bila je linearna s vremenom. Sva mjerenja Ellmanovom metodom izvedena su na spektrofotometru CARY 300 (*Varian Inc.*, Australia) s termostatiranim kućištem pri $25\ ^\circ\text{C}$ u kivetama s optičkim putem od 1 cm ili na čitaču mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO (*Tecan Group Ltd.*, Švicarska) u mikrotitarskim pločicama s optičkim putem od 0,8 cm.

3.2.4. Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima

In vitro metodom određivanja enzimske aktivnosti u rasponu koncentracija supstrata ATCh i u prisutnosti nekoliko koncentracija testiranog oksima određene su konstante reverzibilne inhibicije (K_i) kolinesteraznih enzima, tj. konstante disocijacije kompleksa enzim-oksima, a koje govore o afinitetu enzima prema oksimu. Reakcijska smjesa za određivanje reverzibilne inhibicije kolinesteraza s oksimima sadržavala je $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$ DTNB, fosfatni pufer, enzim u finalnom razrjeđenju te oksim i supstrat željene koncentracije. Koncentracijski raspon oksima za inhibiciju odabran je tako da, pri korištenoj koncentraciji supstrata, inhibicija kolinesteraze bude između 20 % i 80 % kada to omogućava topljivost oksima u fosfatnom puferu.



Slika 3.2. Aktivnost AChE pri tri koncentracije supstrata ATCh i u prisutnosti naznačenih postotaka organskih otapala: A) DMSO, B) metanola, C) etanola i D) izopropanola.

Konačni sadržaj DMSO-a kao otapala za određene hidroksipiridinske oksime održavan je ispod 0,1 % u finalnoj reakcijskoj smjesi kako bi se umanjio njegov utjecaj na aktivnost enzima. Konkretnije, uočena je inhibicija AChE s DMSO-om koja ovisi o prisutnoj koncentraciji supstrata (kompetitivna inhibicija). U širem rasponu koncentracija ATCh u prisutnosti 0,1 % DMSO-a uočena je relativno niska inhibicija aktivnosti AChE od oko 10 % u odnosu na kontrolnu enzimsku aktivnost (**slika 3.2.A**). Osim DMSO-a, testiran je potencijal inhibicije aktivnosti AChE i nekim drugim organskim otapalima poput metanola, etanola i izopropanola (**slika 3.2.B-D**). Navedena otapala tek pri volumnim udjelima od 0,5 % pokazuju određenu

inhibiciju enzima (3 – 15 %), a među njima metanol ima najmanji inhibicijski potencijal. DMSO nije pokazao značajnu inhibiciju aktivnosti BChE enzima pri testiranim koncentracijama oksima. Sličan utjecaj DMSO-a na kolinesteraze, tj. inhibicija aktivnosti rekombinantne i eritrocitne nativne AChE te neznatan utjecaj DMSO-a na aktivnost BChE, pokazan je i u literaturi.¹⁶⁶

Mjerenje enzimske aktivnosti započeto je dodatkom supstrata (0,1 – 1,0 mmol dm⁻³) u reakcijsku smjesu. Za svaku koncentraciju supstrata izmjerena je aktivnost enzima uz barem tri koncentracije oksima. Konačni volumen reakcijske smjese bio je 300 µL i enzimska reakcija je praćena nekoliko minuta pri temperaturi 25 °C na čitaču mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO (*Tecan Group Ltd.*, Švicarska). Tijekom mjerenja, promjena apsorbancije je bila linearna s vremenom. U prisustvu oksima u reakcijskoj smjesi, kod mjerenja enzimske aktivnosti Ellmanovom metodom, dolazi do reakcije između oksimske skupine i ATCh supstrata, tzv. neenzimska reakcija ili oksimoliza, pri čemu također nastaje TCh te produkt TNB⁻ anion koji daje porast apsorbancije u vremenu. Vrijednost neenzimske reakcije se odredila u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 30 µmol dm⁻³ DTNB, fosfatni pufer te oksim (niz koncentracija), a mjerenje reakcije od pet minuta je također započeto dodatkom supstrata ATCh (raspon koncentracija). Kod svih uzoraka tijekom mjerenja promjena apsorbancije bila je linearna s vremenom. Konačna aktivnosti enzima u prisutnosti oksima, $v_{(E+S)}$, je određena iz izraza:

$$v_{(E+S)} = v_{(E+S+OX)} - v_{(S+OX)} \quad (6)$$

gdje $v_{(E+S)}$ predstavlja $\Delta A/\text{min}$ enzimske hidrolize supstrata, $v_{(E+S+OX)}$ ukupnu izmjerenu aktivnost tj. $\Delta A/\text{min}$, a $v_{(S+OX)}$ vrijednost $\Delta A/\text{min}$ neenzimske reakcije za danu koncentraciju oksima i supstrata. Katalitičke konstante reverzibilne inhibicije kolinesteraza oksimima određene su iz Hunter-Downsovog prikaza:

$$K_{i,\text{app}} = \frac{v_i \cdot [\text{OX}]}{v_0 - v_i} \quad (7)$$

$$K_{i,\text{app}} = K_i + \frac{K_i}{K_s} \cdot [\text{S}] \quad (8)$$

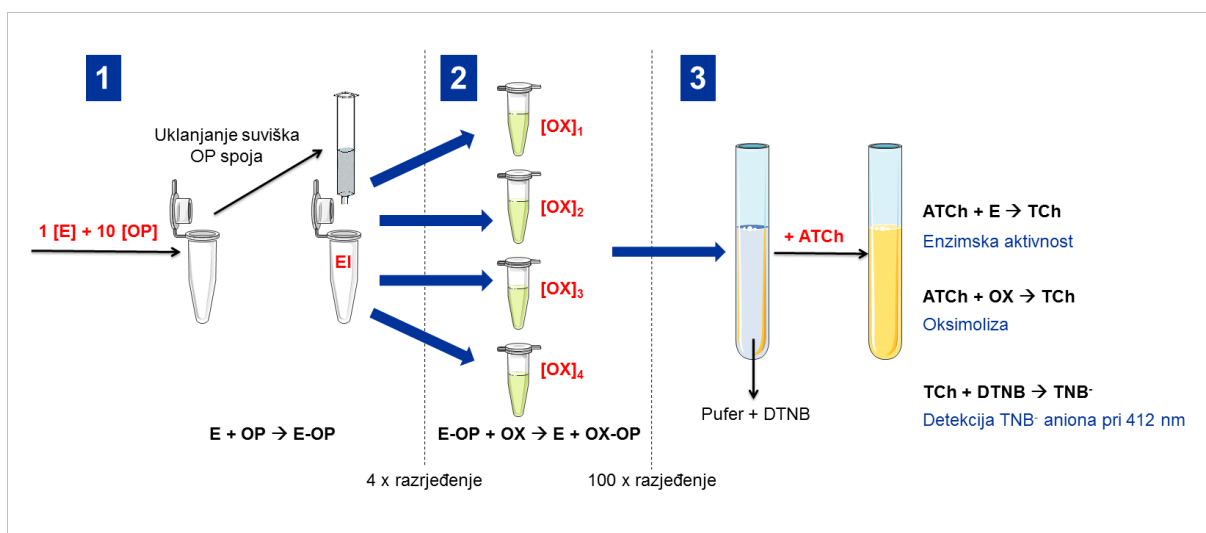
gdje su v_0 i v_i aktivnosti enzima u odsutnosti (0) odnosno prisutnosti oksima kao inhibitora (i), dok $K_{i,app}$ predstavlja prividnu konstantu disocijacije kompleksa između enzima i oksima, budući da se inhibicija prati u prisutnosti supstrata [S] (ATCh). Jednadžba (8) opisuje utjecaj supstrata S na vezanje inhibitora na jedno od mogućih veznih mjesta na enzimu – aktivno ili periferno alosteričko mjesto, te K_i predstavlja stvarnu konstantu disocijacije enzim-oxsim kompleksa, dok K_S predstavlja konstantu disocijacije enzim-supstrat kompleksa (Michaelis-Mentenčin tip kompleksa). Iz ovisnosti $K_{i,app}$ određenih jednadžbom (7) o koncentraciji supstrata, određenima je konstanta K_i (odsječak na ordinati) korištenjem jednadžbe (8) i *Prism6* (*GraphPad Software*, San Diego, SAD).

3.2.5. *Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima*

Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza pomoću oksima određuje se mjerenjem povratka aktivnosti kolinesteraza inhibiranih različitim OP spojevima u određenim vremenskim točkama od početka reaktivacije tj. od dodatka oksima u reaktivacijsku smjesu. Za početno testiranje reaktivacijskog potencijala odabrana je jedna koncentracija oksima, ovisno o afinitetu enzima za pojedine oksime, za probir (engl. *screening*) obećavajućih reaktivatora. Dalje su odabrani oksimi testirani detaljno u rasponu koncentracija kako bi se odredili reaktivacijski parametri.

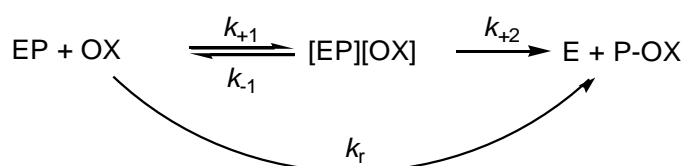
Koncentrirani enzimi AChE ili BChE su inkubirani s pojedinim OP spojem (oko 10 puta u suvišku) u vremenu od 30 – 90 min do postizanja 90 – 100 % inhibicije aktivnosti enzima. Nakon utvrđene inhibicije, suvišak OP spoja uklonjen je filtracijom uzorka pomoću filtracijske kolonice Strata[®] C18-E (*Phenomenex*, Torrance, SAD). Isto je učinjeno i s kontrolnim neinhibiranim enzimom, u koji je umjesto OP spoja dodan odgovarajući volumen vode. Nakon filtracije dodana je 0,1 %-tna otopina BSA u fosfatnom puferu do željenog razrjeđenja inhibiranog enzima, tj. do razrjeđenja koje u analognom finalnom razrjeđenju neinhibiranog enzima daje aktivnost $\Delta A/\text{min} \sim 0,1$ pri 1 mmol dm^{-3} ATCh. Alikvot uzorka inhibiranog enzima je potom razrijeđen u reaktivacijskoj smjesi koja sadržava određenu koncentraciju oksima čime je započet proces reaktivacije. U određenom vremenu (0 – 24 h) od početka reaktivacije, alikvoti reaktivacijske smjese su razrijeđeni u reakcijskoj smjesi za mjerenje aktivnosti enzima, ukupnog volumena 1 mL, koja je sadržavala pufer i $30 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ DTNB. Mjerenje aktivnosti započeto je dodatkom supstrata ATCh (konačne koncentracije $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$) i trajalo je dvije minute. Tijekom mjerenja, kod svih uzoraka promjena apsorbancije bila je linearna s vremenom. Identičan postupak proveden je i s neinhibiranim uzorkom enzima kako bi se

utvrdile kontrolne vrijednosti aktivnosti enzima u prisutnosti ispitivanih koncentracija oksima. Reaktivacija i kontrolna aktivnost praćene su pri 25 °C najviše kroz 24 h tijekom čega je kontrolna aktivnost enzima bila stabilna, osim ako nije drugačije naznačeno u rezultatima. Paralelno s praćenjem reaktivacije inhibiranih kolinesteraza oksimima praćen je i spontani povratak aktivnosti enzima inhibiranih OP spojem te je njen iznos, ukoliko je bio značajan, bio oduzet od vrijednosti oksimom-potpomognute reaktivacije za odgovarajuća vremena. Sva mjerenja enzimske aktivnosti u eksperimentima reaktivacije izvedena su na spektrofotometru CARY 300 (Varian Inc., Australia). Budući da je uočeno da brzina reaktivacije ovisi i o koncentraciji inhibiranog enzima u reaktivacijskoj smjesi,¹⁶⁷ te dodatno kako bi se prilikom razrjeđenja alikvota u Ellmanovoj smjesi učinkovito zaustavila reakcija reaktivacije i umanjio utjecaj oksimolize u ukupno izmjerenim vrijednostima enzimske aktivnosti, odnos razrjeđenja između koraka bila su kao na **slici 3.3**.



Slika 3.3. Shematski prikaz pokusa reaktivacije s naznačenim odnosom međusobnih razrjeđenja između tri glavna koraka: 1) inhibicije enzima (E) organofosforinim spojem (OP), 2) reaktivacije inhibiranog enzima (E-OP) s nizom koncentracija oksima ($OX_{1,2,3,4,\dots,n}$), te 3) određivanje povratka enzimske aktivnosti prema Ellman-ovoj metodi. Prikaz prema ref. 167.

Reaktivacija se opisuje sljedećom shemom:



Shema 2

gdje EP predstavlja fosfilirani enzim, [EP][OX] reverzibilni kompleks Michaelis-Mentenčinog tipa između EP i oksima (OX), E je slobodni enzim, a P-OX fosfilirani oksim. Dodatno, k_{+2} je konstanta brzine reaktivacije prvog reda (odnosno konstanta brzine nukleofilne supstitucije između oksima i OP ostatka vezanog na katalitički serin), a k_r je ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda. Reakcija reaktivacije (**shema 2**) opisana je jednadžbom:

$$\ln \frac{[\text{EP}]_0}{[\text{EP}]_t} = \frac{k_{+2} \cdot [\text{OX}]}{K_{\text{OX}} \cdot [\text{OX}]} \cdot t = k_{\text{obs}} \cdot t \quad (9)$$

gdje su $[\text{EP}]_0$ i $[\text{EP}]_t$ koncentracije fosfiliranog enzima u vremenu 0 odnosno u vremenu t , K_{OX} odgovara omjeru $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ te je približno jednaka konstanti disocijacije [EP][OX] kompleksa, a k_{obs} je konstanta brzine reaktivacije prvog reda za određenu koncentraciju oksima. Ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda, k_r , izražena je kao omjer:

$$k_r = \frac{k_{+2}}{K_{\text{OX}}} \quad (10)$$

Rezultati mjerenja izraženi su kao postotak reaktivacije enzima (*Reakt*):

$$\text{Reakt} = \frac{v_{(\text{EP}+\text{OX})_t}}{v_{(\text{E}+\text{OX})}} \cdot 100\% \quad (11)$$

gdje $v_{(\text{EP}+\text{OX})_t}$ predstavlja aktivnost reaktiviranog enzima oksimom u vremenu t , dok $v_{(\text{E}+\text{OX})}$ predstavlja aktivnost neinhibiranog enzima u prisutnosti oksima (kontrolna aktivnost). Ovisnost postotka reaktivacije dobivenog za pojedinu koncentraciju oksima (*Reakt*) o vremenu reaktivacije t obično slijedi izgled jednofazne eksponencijalne krivulje (reaktacijska krivulja):

$$\text{Reakt} = \text{Reakt}_{\text{max}} \cdot (1 - e^{-k_{\text{obs}} \cdot t}) \quad (12)$$

gdje je $\text{Reakt}_{\text{max}}$ maksimalni ostvaren postotak reaktivacije. Vrijednost k_{obs} za svaku koncentraciju oksima je određena direktno iz jednadžbe (12) ili se, u slučaju kada reaktivacija

s pojedinim oksimom dolazi do različitih $Reakt_{max}$, crta graf ovisnosti $\log(100-Reakt)$ o vremenu reaktivacije za početni linearni dio reaktivacijske krivulje kako bi se eliminirao utjecaj različitih platoa. Budući da $(100-Reakt)$ odgovara $100 \cdot [EP]_t/[EP]_0$, konstante brzine reaktivacije određene su iz grafa ovisnosti k_{obs} o koncentraciji oksima prema jednadžbi (9). Kada je testirani raspon koncentracija pojedinog oksima pratio nelinearnu ovisnost jednadžbe (9) bilo je moguće odrediti reaktivacijske parametre k_{+2} i K_{OX} te je k_r izračunata pomoću jednadžbe (10). Kada je raspon koncentracija oksima pokazivao linearnu ovisnost jednadžbe (9) k_r je bila jednaka nagibu tog pravca. Za sve izračune reaktivacijskih parametara korišten je *Prism6* (*GraphPad Software*, San Diego, SAD).

3.3. In silico metode

3.3.1. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava oksima

Korištenjem računalnog programa ChemAxon's Marvin (verzija 16.11.7.0; Budimpešta, Mađarska) odredila su se sljedeća fizikalno-kemijska svojstva oksima: koeficijent lipofilnosti, $\log P$; koeficijent lipofilnosti pri pH 7,4 $\log D_{7,4}$; konstante disocijacije određenih skupina u molekuli, pK_a ; broj donora i akceptora vodikovih veza, HBD (engl. *hydrogen-bond donor*) i HBA (engl. *hydrogen-bond acceptor*); broj veza koje se mogu rotirati, RB (engl. *rotatable bond*); molarna masa, M; područje ukupne polarne površine molekule, TPSA (engl. *total polar surface area*). Koeficijenti lipofilnosti $\log P$ i $\log D_{7,4}$ određeni su korištenjem *Consensus* metode implementirane u ChemAxon's Marvin programu. Vrijednosti konstanti disocijacije, pK_a , i udio pojedinih mikrospecija pri određenim pH vrijednostima, procijenjeni su za uvjete gdje je ionska jakost definirana koncentracijom kationa (Na^+ , K^+) i aniona (Cl^-) jednakoj $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ te pri temperaturi $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.2. Molekulska modeliranje oksima u 3D strukture kolinesteraza

Oksimi su metodom molekuskog pristajanja (engl. *molecular docking*) smješćavani u aktivno mjesto kristalnih struktura kolinesteraza inhibiranih s određenim OP spojevima koje su dostupne u podatkovnoj bazi PDB (engl. *Protein Data Bank*). Kao rigidni receptori su korištene mišja AChE inhibirana VX-om (PDB: 2Y2U), ljudska BChE (PDB: 2PM8) na koju je konjugiran ostatak VX-a, mišja AChE inhibirane ciklosarinom (PDB: 3ZLU) te AChE inhibirane tabunom (PDB: 2JEZ, 3DL4, 2JF0). Molekulskim modeliranjem se pokazalo kako

se odabrani oksimi smještaju unutar aktivnog ždrijela enzima inhibiranog OP spojem, koje interakcije s aminokiselinskim ostacima pritom mogu ostvariti te koja je udaljenost kisika oksimske skupine i atoma fosfora OP spoja.

Prije svega, konjugati inhibiranih kolinesteraza dizajnirani su i minimizirani korištenjem MMFF94 (*Merck Molecular Forcefield 94*) polja sila implementiranog u ChemBio3D Ultra 12.0 (*PerkinElmer Inc.*, SAD). Za molekulsko pristajanje oksima korišteno je CHARMM (*Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics*) polje sila implementirano u Dock Ligands protokolu (CDOCKER) računalnog paketa Biovia Discovery Studio Client v17.2 (*Accelrys*, San Diego, SAD). Prvo je unutar AChE ili BChE definirano vezno mjesto tj. aktivno ždrijelo u enzimskoj strukturi okruženo sferom ($r = 13 \text{ \AA}$). Zatim je generiran set od 20 nasumičnih konformacija svakog oksima unutar definiranog veznog mjesta. Nakon toga je zadržano 20 nasumičnih orijentacija oksima s energijom manjom od 30 vdW, i taj proces je nastavljen dok nije pronađen željeni broj konformacija dovoljno niske energije ili dok nije dostignut maksimalan broj loših orijentacija (800). Nadalje, svaka orijentacija je podvrgnuta molekulskoj dinamici metodom simuliranog kaljenja (engl. *simulated annealing*) pri čemu je temperatura povećana na 700 K i zatim spuštена na 310 K (2000 ili 5000 ciklusa zagrijavanja i hlađenja), a dodatno je korišteno proširenje mreže (engl. *grid extension*) (8,0 Å). Zatim je izvedena konačna minimizacija svake poboljšane poze liganda u rigidnom receptoru korištenjem punog potencijala (engl. *full potential*) te je za svaku konačnu pozu izračunata CHARMM energija (zbroj interakcijske energije i napetosti liganda) i interakcijska energija zasebno prema čemu je poze sortirane te je odabrano 20 najbolje ocijenjenih poza (najnegativnijih, dakle najpovoljnijih za vezanje). Konačne odabrane poze za svaki kompleks enzim-oksim minimizirane su korištenjem *Minimization* protokola sa *Smart Minimizer* algoritmom (1000 koraka metode najstrmijeg spusta s iznosom vrijednosti tolerancije RMS gradijenta 3 iza čega slijedi minimizacija metodom konjugiranog gradijenta s vrijednostima maksimalnih koraka (*Max Steps*) i RMS gradijenta koje iznose 500 i 0,01) pri čemu je korišten implicitni model otapala (dielektrične konstante 80) *Generalized Born with Molecular Volume*.^{145,146} Napolarna površina korištena je za procjenu nepolarne komponente solvacijske energije. Vrijednost granične udaljenosti korištena za brojanje nevezanih interakcijskih parova namještena je na 14 Å.

3.4. Eksperimentalno određivanje lipofilnosti oksima

3.4.1. Kemikalije

Za određivanje Chrom $\log D$ korištene su 10 mmol dm⁻³ izvorne otopine oksima pripravljene u DMSO-u (JR585, JR595, RM048, GM508), metanolu (GM415) ili destiliranoj vodi (klorpiridinijevi oksimi, HI-6, 2-PAM, obidoksim, TMB-4; K027, K048, K203, DAM, MINA). Ostale korištene kemikalije su acetonitril (*Merck*, Njemačka) te mravlja kiselina, octena kiselina i amonijev acetat kupljene od *Sigma-Aldrich*, Njemačka. Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

3.4.2. Određivanje Chrom $\log D$ koeficijenta lipofilnosti oksima

Kromatografska određivanja koeficijenata lipofilnosti Chrom $\log D$ izvedena su u laboratoriju Fidelta d.o.o., Zagreb, Hrvatska. Pitom je korištena analiza tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC1100, *Agilent Technologies*, SAD) spregnute s masenim spektrometrom (*Waters Micromass Quattro micro API*TM, SAD). Iz 10 mmol dm⁻³ izvornih otopina oksima pripravljena su daljnja razrjeđenja u acetonitrilu koncentracije 1,25 mmol dm⁻³. Volumen uzorak 2 mL se injektirao na kolonu Luna C18 (duljine 50 mm, unutarnjeg promjera 3 mm, veličine čestica 5 μm, veličine pora 100 Å; *Phenomenex*, Torrance, SAD) te je mjerenje trajalo 5 minuta uz brzinu protoka 1,0 mL min⁻¹, temperaturu kolone 25 °C i temperaturu uzorka 15 °C. Mobilna faza sastojala se od gradijenta otopine A (smjesa 0,1 % mravlje kiseline pri pH 2,7 ili 50 mmol dm⁻³ amonijevog acetata pri pH 7,4 i pH 10,5) te otopine B (acetonitril): od 100 % otopine A prema 100 % otopine B (0 – 3 min), 100 % otopina B (3 – 3,5 min), od 100 % do 0 % otopine B (3,5 – 3,7 min), te vraćanje na početne uvjete s 100 % otopine A (3,7 – 5 min). Iz snimljenih UV kromatograma su određena retencijska vremena oksima. Također, za kalibracijsku krivulju eksperimentalno su određena retencijska vremena standardnih spojeva poznatih kromatografski određenih vrijednosti indeksa hidrofobnosti (CHI, engl. *chromatographic hydrophobicity index*) objavljenim u literaturi¹⁶⁸ te je iz dobivene jednadžbe pravca izračunata CHI vrijednost oksima, a zatim je koeficijent lipofilnosti Chrom $\log D$ izračunat prema jednadžbi:

$$\text{Chrom } \log D = \text{CHI} \cdot 0,0857 - 2 \quad (13)$$

3.5. Određivanje toksičnog učinka oksima na stanice

3.5.1. Kemikalije, mediji i stanične linije

U pokusima izvođenim na staničnim linijama koristio se PBS pufer (od engl. *phosphate-buffered saline*; Kemika, Hrvatska). Za ispitivanje citotoksičnosti koriste se spojevi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol (MTS) i fenazin-metosulfat (PMS) koji hvata elektrone i čini otopinu MTS spoja stabilnom. Izvorne otopine MTS spoja (2 mg dm^{-3}) i PMS spoja ($0,92 \text{ mg dm}^{-3}$) pripravljene su u PBS puferu i čuvane na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do pokusa. Na dan pokusa pripremana je zasebna otopina PMS:MTS:PBS u odnosu 1:20:120 (MTS reagens). U pokusima određivanja indukcije oksidacijskog stresa korišten je reagens 2',7'-diklorofluorescin diacetat (DCFDA) pripremljen kao izvorna otopina koncentracije 10 mmol dm^{-3} i čuvana na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Također, korištena je i 10 mol dm^{-3} izvorna otopina vodikovog peroksida (30 % v/v; Kemika, Hrvatska) iz kojeg je dalje pripremljena $50 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ otopina razrjeđenjem u PBS-u. Sve kemikalije bile su analitičke čistoće.

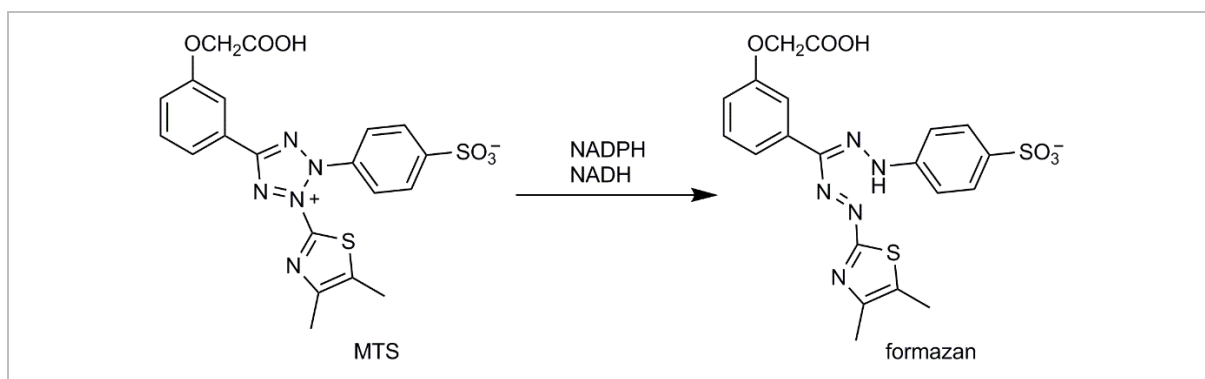
Od staničnih linija bile su korištene adherentna stanična linije ljudskih stanica neuroblastoma SH-SY5Y (ECACC 94030304; *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska), adherentna stanična linija ljudskih stanica astrocitoma mozga, 1321N1 (ECACC 86030402; *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska), adherentna stanična linija ljudskih hepatocita HepG2 (ATCC HB8065; *American Type Culture Collection*, SAD) i adherentna stanična linija svinjskih stanica bubrega, PK-15 (engl. *porcine kidney*; ATCC® CCL-33™; *American Type Culture Collection*, SAD).

Sve stanice uzgajane su pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO₂ i temperaturi 37 °C) i u odgovarajućim medijima. SH-SY5Y stanična linija uzgajana je u *Dulbecco's modified Eagle F12* (DMEM; *Sigma-Aldrich*, SAD) mediju uz dodatak 15 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS) (*Gibco*, Paisley, UK), 2 mmol dm^{-3} glutamina i 1 % neesencijalnih aminokiselina. 1321N1 stanična linija uzgajana je u DMEM mediju (*Sigma-Aldrich*, SAD) uz dodatak 10 % (v/v) FBS (*Gibco*, Paisley, UK) i 2 mmol dm^{-3} glutamina. HepG2 stanična linija uzgajana je u *Eagle's Minimum Essential* mediju s Earlovim solima i natrijevim bikarbonatom bez L-glutamina (EMEM; *Sigma-Aldrich*, SAD) uz dodatak 10 % (v/v) FBS (*Gibco*, Paisley, UK) i 2 mmol dm^{-3} glutamina. PK-15 stanična linija uzgajana je u RPMI-1640 mediju (*Gibco*, Paisley, UK) uz dodatak 10 % (v/v) FBS (*Gibco*, Paisley, UK). Za potrebe pokusa, stanice su

nasadene u mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji od 10^5 stanica po jažici dva dana prije pokusa u slučaju staničnih linija SH-SY5Y i HepG2 čije vrijeme diobe iznosi 48 h. U slučaju staničnih linija 1321N1 ili PK-15 čije vrijeme diobe iznosi 24 h, stanice su nasadene u istoj koncentraciji jedan dan prije pokusa. Za odvajanje stanica od podloge koristila se otopina 0,25 % tripsina i EDTA (*Sigma-Aldrich*, SAD), nakon čega su se stanice resuspendirale i nasadile u mikrotitarske pločice s 96 jažica za pokuse.

3.5.2. Određivanje citotoksičnosti oksima

Za potrebe određivanja citotoksičnosti oksima, tj. inhibicije staničnog rasta uslijed tretmana oksimima, koristio se MTS test prema protokolu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (*Promega*, SAD). Ovaj test citotoksičnosti zasniva se na činjenici da se MTS tetrazolijev spoj (Owenov reagens) u živim stanicama reducira u formazan pomoću NADPH ili NADH spojeva koji nastaju u metabolički aktivnim stanicama u reakcijama kataliziranim s dehidrogenazama (**slika 3.4**). Koncentracija nastalog formazana određuje se mjerenjem apsorbancije na 490 nm i direktno je proporcionalna broju živih stanica u staničnoj kulturi.¹⁶⁹



Slika 3.4. Princip MTS testa citotoksičnosti gdje dolazi do redukcije MTS spoja uslijed aktivnosti dehidrogenaza u metabolički aktivnim stanicama

Na dan pokusa stanični medij je zamijenjen otopinama oksima u staničnom mediju u nizu koncentracija (serijska razrjeđenja oksima 1:2 počevši od 800 ili 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) ukupnog volumena 120 μl po jažici. Stanice su inkubirane s otopinama oksima tijekom 24 sata pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO_2 i temperaturi 37 °C). Nakon inkubacije stanice su isprane s PBS puferom te je dodan MTS reagens do ukupnog volumena 120 μL , a nakon 1 – 4 sata je očitana apsorbancija pri 490 nm na čitaču mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO (*Tecan Group Ltd.*, Švicarska). Otopalo DMSO nije imao nikakvog utjecaja na stanično

preživljenje u onim koncentracijama koje su prisutne kod najviših testiranih koncentracija oksima (0,8 %). Rezultati citotoksičnosti prikazani su kao postotak inhibicije staničnog rasta I u odnosu na netretirane kontrolne stanice:

$$I = \left[1 - \frac{A_t}{A_n} \right] \cdot 100 \% \quad (14)$$

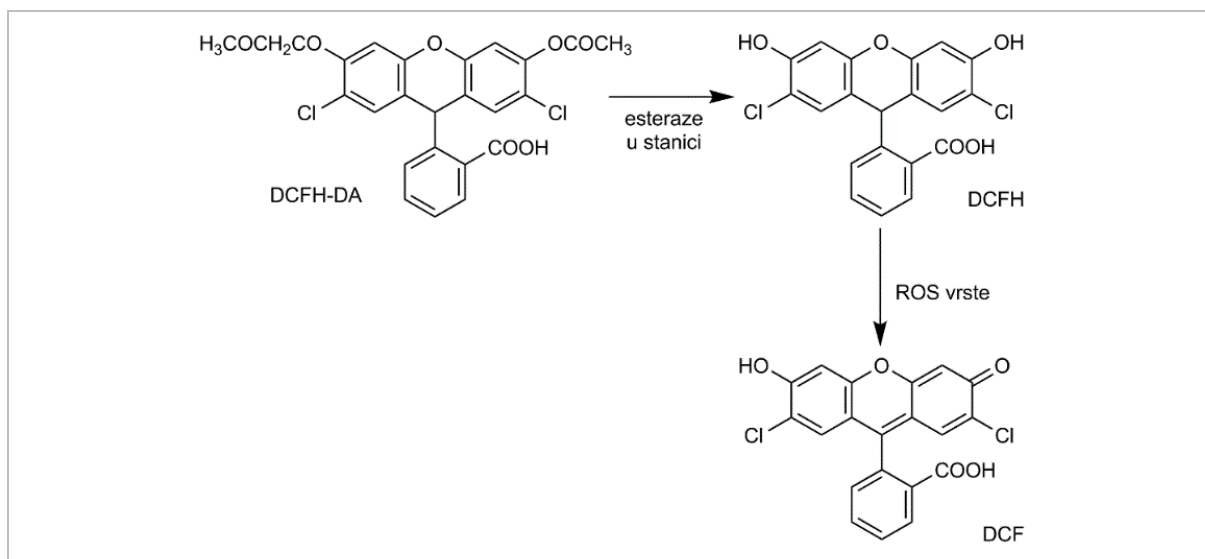
gdje je A_t apsorbancija izmjerena u tretiranih stanica, a A_n apsorbancija izmjerena u netretiranih stanica. Kada je u rasponu testiranih koncentracija bio određen cijeli profil citotoksičnosti ($I = 0 - 100$ %) određena je i koncentracija oksima pri kojoj je inhibicija staničnog rasta bila 50 % (IC_{50}) pomoću jednadžbe za sigmoidalnu ovisnost definiranoj u *Prism6* (*GraphPad Software*, San Diego, SAD).

3.5.3. Određivanje indukcije oksidacijskog stresa oksimima

Određivanje indukcije oksidacijskog stresa u stanicama temelji se na činjenici da fluorogeni reagens, 2',7'-diklorofluorescin diacetata (DCFH-DA) ulazi u stanice, gdje pomoću staničnih estera deacetilacijom prelazi u nefluorescentni oblik (DCFH) kojeg ROS vrste oksidiraju u fluorescentni produkt 2',7'-diklorofluorescein (DCF) (**slika 3.5**). Indikator oksidacijskog stresa izazvanog u stanicama je upravo DCF spoj čiji se intenzitet fluorescencije određuje fluorimetrijski. DCFDA test odrađen je prema protokolu DCFDA - Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay (*Abcam*, UK).¹⁷⁰

Na dan pokusa je stanični medij zamijenjen s DCFDA spojem u PBS puferu (finalne koncentracije $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$) u kojem su stanica bile inkubirane tijekom 45 minuta i pri kontroliranim uvjetima (5 % $p\text{CO}_2$ i temperaturi 37°C). Nakon inkubacije, stanice se ispiru s PBS puferom te se dodaju otopine oksima određenih koncentracija (serijska razrjeđenja 1:2 počevši od $400 \mu\text{mol dm}^{-3}$) pripravljene u PBS puferu. Nakon tretmana od četiri sata pri kontroliranim uvjetima (5 % $p\text{CO}_2$ i temperaturi 37°C), određuje se intenzitet DCF produkta na čitaču mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO (*Tecan Group Ltd.*, Švicarska) pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 485 nm, te emisijskoj valnoj duljini od 535 nm. Istovremeno se određuje sadržaj ROS vrsta i u netretiranim stanicama. Količina DMSO otapala prisutna kod najvećih koncentracija nekih oksima nije pokazivala dodatnu indukciju ROS vrsta u stanicama

u odnosu na netretirane stanice. Istovremeno je ispitana indukcija ROS vrsta u prisutnosti $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ vodikovog peroksida kao pozitivne kontrole, tj. spoja iz skupine ROS vrsta. Rezultati su prikazani kao relativni odnos indukcije ROS vrsta u stanicama tretiranim s oksimima ili H_2O_2 spojem i indukcije ROS vrsta u netretiranim kontrolnim stanicama.



Slika 3.5. Princip određivanja indukcije oksidacijskog stresa u stanicama: DCFH-DA ulazi u stanice gdje pomoću staničnih esteraza deacetilacijom prelazi u oblik DCFH kojeg ROS vrste oksidiraju u fluorescentni produkt DCF.

3.6. Metabolička stabilnost oksima *in vitro*

3.6.1. Kemikalije i mikrosomi

U pokusima ispitivanja metaboličke stabilnosti su korištene sljedeće kemikalije: fosfatni pufer, DMSO, β -NADP, glukoza-6-fosfat, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza i magnezijev klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) i mravlja kiselina nabavljeni od *Sigma-Aldrich* (SAD) te acetonitril i metanol nabavljeni od *Mercka* (Njemačka). Sve kemikalije bile su analitičke čistoće.

Izvorne otopine oksima koncentracije 10 mmol dm^{-3} su pripravljene u DMSO-u (JR585, JR595, RM048, GM508) ili metanolu (GM415) i čuvane na 4°C . Korišteni su kontrolni spojevi propranolol hidroklorid i kofein (*Sigma-Aldrich*, SAD) te testosteron (*Steraloids*, Newport, SAD). Ljudski i mišji jetreni mikrosomi su kupljeni od *BD Biosciences* (San Jose, SAD).

3.6.2. Određivanje metaboličke razgradnje oksima uslijed inkubacije s mikrosomima

Eksperimenti određivanja metaboličke stabilnosti izvedeni su u laboratoriju Fidelte d.o.o., Zagreb, Hrvatska. Oksimi finalne koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ u fosfatnom puferu (50 mmol dm^{-3} , pH 7,4) su inkubirani 60 minuta na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ zajedno s jetrenim mikrosomima u odsustvu i prisustvu NADPH kofaktora za kontrolu stabilnosti u puferu. Metabolička aktivnost jetrenih mikrosoma je verificirana pomoću pozitivnih kontrola testosterona i propranolola te negativne kontrole kofeina. Koncentracija oksima i kontrolnih spojeva određena je na masenom spektrometru ABSciex API 4000 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (*Sciex, Division of MDS Inc., Toronto, Kanada*) spregnutim s tekućinskim kromatografom ultravisoke djelotvornosti UHPLC Nexera X2 (*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 mm; *Phenomenex, Torrance, SAD*) na $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Vodena otopina je bila 0,1 % mravlja kiselina u deioniziranoj vodi, a kao organska pokretna faza korištena je smjesa vode, acetonitrila i mravlje kiseline u volumnim omjerima 90:10:0,1 (v/v/v). Brzina protoka pokretne faze bila je $700 \mu\text{L min}^{-1}$ tijekom svih mjerenja. Gradijentna elucija je bila kako slijedi: 2 %-tna organska pokretna faza (0 – 0,15 min), gradijent od 2 do 95 % organske pokretne faze (0,15 – 0,7 min), 95 % organske pokretne faze (0,7 – 1,1 min), gradijent od 95 do 2 % organske pokretne faze (1,1 – 1,11 min) te vraćanje početnih uvjeta s 95 % vodenom pokretnom fazom (1,11 – 1,5 min). Za detekciju masenim spektrometrom korištena je ionizacija elektroraspršenjem uz primjenu pozitivnog potencijala s temperaturom izvora iona od $550 \text{ }^\circ\text{C}$ te vremenom praćenja iona od 75 ms. Kvantifikacija je izvedena metodom praćenja jednostrukih ili višestrukih reakcija (MRM, od engl. *multiple reaction monitoring*) pri prijelazima specifičnim za svaki spoj: JR585 (m/z 292,3 → 207,1), JR595 (m/z 280,3 → 193,2), RM048 (m/z 294,3 → 207,1), GM415 (m/z 400,2 → 236,2), GM508 (m/z 519,4 → 365,2). Diklofenak (m/z 296,1 → 213,7) je korišten kao unutarnji standard.

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 i uz pretpostavku da čovjek ima 52,5 mg proteina po g jetre, iz $t_{1/2}$ je određen *in vitro* intrinzični klirens Cl_{int} spoja pomoću jednadžbe:

$$Cl_{\text{int}} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \times \frac{V}{m} \quad (15)$$

gdje je V predstavlja volumen krvi po inkubaciji, 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 *in vivo* klirensa Cl koristi se jednadžba:

$$Cl = \frac{Cl_{\text{int}} \cdot A \cdot B \cdot C}{C + Cl_{\text{int}} \cdot A \cdot B} \quad (16)$$

gdje je A omjer miligrama proteina po gramu jetre, B označava omjer mase jetre i mase tijela i specifičan je za vrstu (kod čovjeka iznosi 25,7, a kod miša 87,5.), a C je protok krvi kroz jetru ($\text{mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$) specifičan za vrstu (kod čovjeka iznosi 21/1,26 $\text{mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$; a kod miša 131/7,86 $\text{mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$). *In vivo* relativni hepatski klirens, LBF, izračunat iz omjera vrijednosti Cl i C , služio je za svrstavanje spoja u jednu od tri kategorije hepatskog klirensa: niski (LBF < 30 %), umjereni (LBF = 30 – 70 %) ili visoki (LBF > 70 %) hepatski klirens.

3.7. Farmakokinetika oksima JR595 na modelu miša

3.7.1. Kemikalije i životinje

Koncentracije oksima JR595 u uzorcima krvi i mozga miša određene su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Kemikalije korištene pri pripremi uzoraka i HPLC analizi su: trikloroetna kiselina (TCA) (*Kemika*, Zagreb), acetonitril (*J. T. Baker*, Deventer, Nizozemska), mravlja kiselina (*Kemika*, Zagreb) te deionizirana voda pripravljena primjenom sustava Mili-Q za pročišćavanje vode (*Milipore*, Bedford, SAD). Sve kemikalije bile su analitičke čistoće. Za optimizaciju analitičkog postupka pripravljena je izvorna otopina JR595 TFA u vodi masene koncentracije $295,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, iz koje su daljnjim razrjeđivanjem u vodi ili 5 % TCA u vodi pripravljene standardne otopine za HPLC analizu i pripravu modelnih uzoraka. Sve otopine su čuvane na 4 °C. Otopina JR595 TFA za tretman životinja je pripravljena kao 40mg mL^{-1} otopina u fiziološkoj otopini na dan pokusa.

Ispitivanje farmakokinetike oksima JR595 provedeno je na mužjacima miševa (soj CD-1) težine 30 do 40 grama, starosti 2 do 2,5 mjeseca. Tijekom svih eksperimenata, životinje su boravile u makrolonskim kavezima pod kontroliranim uvjetima (periodična izmjena svjetla svakih 12 sati, temperatura 24 °C) sa slobodnim pristupom hrani (4RF21; *Mucedola*, Italija) i vodi. Eksperimenti su provedeni u skladu s Etičkim povjerenstvom Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska i uz odobrenje Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Miševi CD-1 soja nabavljeni su s Instituta Ruđer Bošković (Pogon laboratorijskih životinja, Zavod za molekularnu medicinu, Zagreb, Hrvatska).

3.7.2. *Tretiranje miševa i priprema uzoraka*

Spoj JR595 apliciran je *i.m.* u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine miša. Volumen aplicirane doze, V_{apl} , 40 mg mL⁻¹ otopine JR595 ovisio je o tjelesnoj težini miša, $m_{\text{miš}}$, i izračunat je prema jednadžbi:

$$V_{\text{apl}} = \frac{m_{\text{miš}} \cdot 100 \text{ mg kg}^{-1}}{40 \text{ mg mL}^{-1}} \quad (17)$$

Nakon određenog vremena od aplikacije, životinje su anestetizirane neposredno prije žrtvovanja sukladno uputama AVMA (*Guidelines for the Euthanasia of Animals*, 2013).¹⁷¹ Anestezija je izazvana *i.p.* ubrizgavanjem koktela Narketan, 80 mg kg⁻¹/Xylapan, 12 mg kg⁻¹. Smrt je nastupila uslijed presijecanja arterije prilikom čega je krv sakupljena direktno iz arterije u hepariniziranu epruvetu (34 I.U.; *BD Vacutainer*, Kanada). Zatim je obavljena perfuzija fiziološkom otopinom kako bi se uklonila zaostala krv iz krvožilnog sustava organa. Prikupljena tkiva su trenutno smrznuta u tekućem dušiku te pohranjena na - 80 °C do daljnje analize. Krv je prije pohranjivanja na - 80 °C prebačena u plastične epruvete.

Prije analize, uzorci krvi su odmrznuti na sobnoj temperaturi i pripremljeni na prije optimiziran način. Alikvot uzorka krvi od 0,5 mL pomiješan je s 1,0 mL 5 % TCA kiselinom radi taloženja proteina. Nakon toga, uzorak je centrifugiran 10 minuta na 10 000 rpm u centrifugi Mikro 22R (*Hettich*, Njemačka) pri 4 °C. Supernatant je profiltriran kroz PTFE-filtar veličine pora 0,2 μm (*Acrodisc CR13*; *Waters*, Milford, SAD) i analiziran tekućinskom kromatografijom. Prema potrebi uzorci su razrjeđivani dodatkom 5 %-tne TCA kiseline. Prije

pripreme i analize, uzorci mozga su odmrznuti na sobnoj temperaturi te odvagani. U uzorke mozga se dodao 1 mL deionizirane vode i uzorak je homogeniziran pomoću homogenizatora T10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA, Njemačka). U homogenat je dodano 2 mL 5 %-tne TCA kiseline nakon čega je uzorak centrifugiran 10 min na 10000 rpm na centrifugi Universal 320/320R (Hettich, Njemačka) pri 4 °C. Supernatant je profiltriran kroz PTFE-filtar veličine pora 0,2 µm (Acrodisc CR13; Waters, Milford, SAD) i dalje analiziran tekućinskom kromatografijom.

3.7.3. Određivanja koncentracije oksima JR595 u biološkim uzorcima

Pripremljeni uzorci analizirani su na tekućinskom kromatografu Varian (Walnut Creek, SAD) sastavljenom od pumpe ProStar 230 SDM, UV detektora ProStar 330 s nizom fotodioda (UV-DAD, od engl. Diode-Array Detector) i automatskog uzorkivača AutoSampler 410. Pritom je korištena kromatografska kolona Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm) s predkolonom Gemini C18 (4 mm x 3 mm), obje veličine čestica 5 µm (Phenomenex, Torrance, SAD). Kao pokretna faza su korišteni acetonitril (faza A) i 5 %-tna mravlja kiselina u vodi (faza B). Oksim je eluiran s kolone uz primjenu linearnog gradijenta: od 10 % faze A i 90 % faze B do 100 % faze A kroz 30 minuta uz protok pokretne faze 1 mL min⁻¹. Volumen injektiranog uzorka bio je 100 µL, a valna duljina određivanja oksima JR595 bila je 230 nm. Primjer kromatograma dobivenih tekućinskokromatografskom analizom standardne otopine oksima JR595 te uzorka krvi i mozga dan je na slici 3.6.

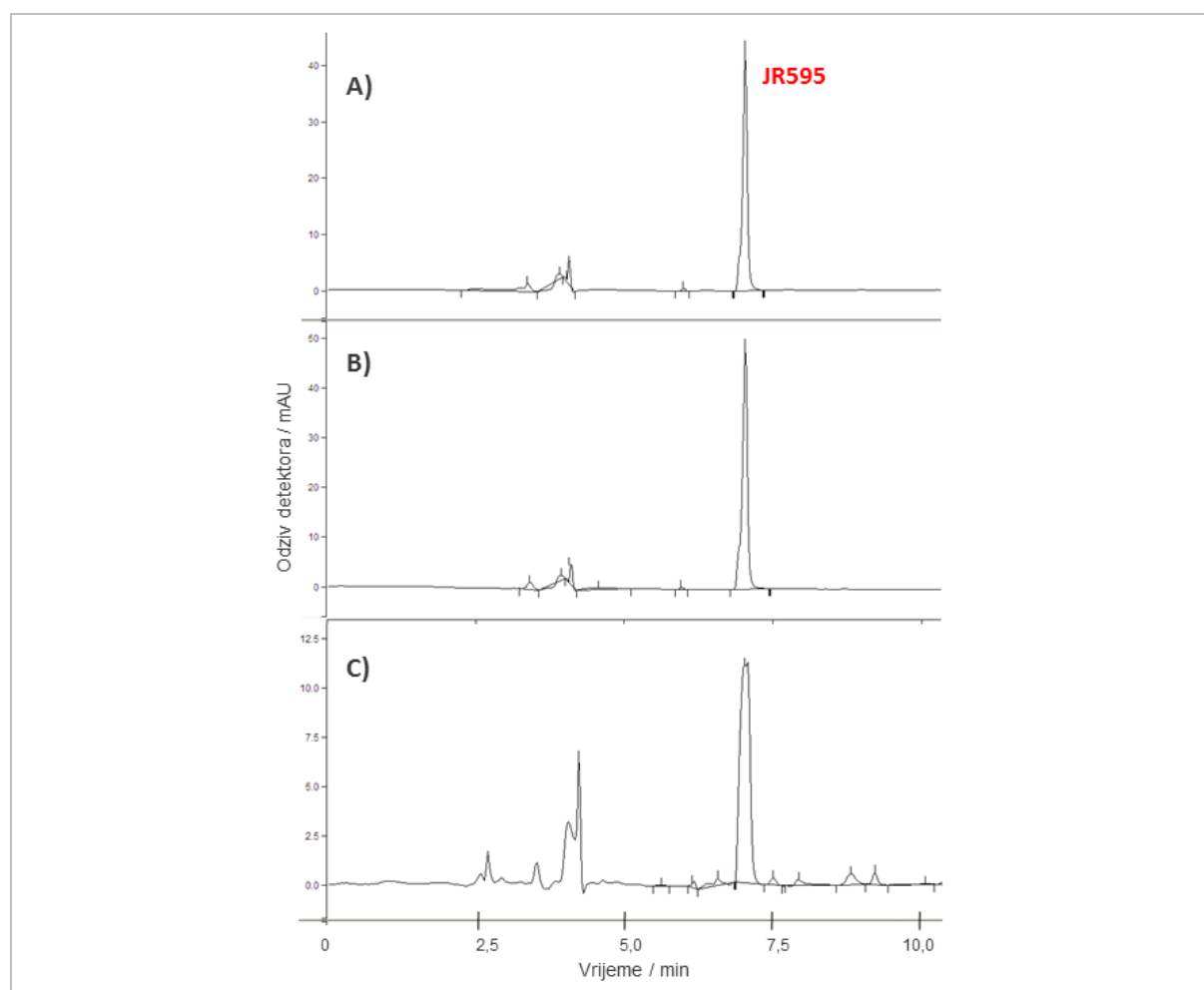
Razrada analitičkog postupka uključivala je optimizaciju uvjeta analize tekućinskom kromatografijom, utvrđivanje linearnosti odziva tekućinskokromatografskog detektora i određivanje granice detekcije. Snimanjem UV spektra oksima JR595 otopljenog u deioniziranoj vodi i TCA odabrana je valna duljina apsorpcijskog maksimuma prikladna za detekciju. Primjenom gradijentnog eluiranja s acetonitriлом i 5 %-tnom vodenom otopinom mravlje kiseline postignuta je dobra osjetljivost i selektivnost određivanja na nepolarnoj koloni. Linearnost odziva UV (DAD) detektora provjerena je analizom standardnih otopina oksima JR595 (konačne koncentracije 0,295, 0,738 i 1,475 µg mL⁻¹). Regresijska analiza kromatografskih podataka ukazuje na linearnost odziva detektora u rasponu masenih koncentracija od 0,295 µg mL⁻¹ do 1000 µg mL⁻¹ (koeficijente korelacije u rasponu od 0,9987–0,9998). Granica detekcije određena je analizom standardnih otopina temeljem omjera visine signala analiziranog spoja i šuma osnovne linije 3:1, a djelotvornost postupka pripreme

uzorka ispitana je analizom modelnih uzoraka krvi i mozga kako je prikazano u **tablici 3.4.** Modelni uzorci krvi/mozga s konačnim masenim koncentracijama oksima JR595 od 14,76 i 29,52 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pripremljeni su dodatkom standardnih otopina oksima JR595 u krv odnosno homogenat mozga netretiranih životinja, te su oni obrađeni na isti način kako je objašnjeno za uzorke tretiranih životinja. Standardne otopine za analizu tekućinskom kromatografijom (konačne koncentracije 0,295, 0,738 i 1,475 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pripravljene su pipetiranjem određenog volumena izvorne otopine i razrjeđivanjem s 5 %-tnom TCA kiselinom u deioniziranoj vodi.

Tablica 3.4. Djelotvornost postupka pripreme uzorka (\pm standardna pogreška) i granice detekcije spoja JR595 u pripremljenim uzorcima krvi i mozga.

Koncentracija JR595 u modelnom uzorku / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Djelotvornost ^a / %		Granica detekcije / $\mu\text{g mL}^{-1}$
	Krv	Mozak	
0,492	75 \pm 0,1 (5)	50 \pm 0,04 (5)	0,130
1,476	102 \pm 0,1 (6)	92 \pm 0,1 (7)	0,130

^aBroj u zagradi predstavlja broj analiziranih uzoraka (N).



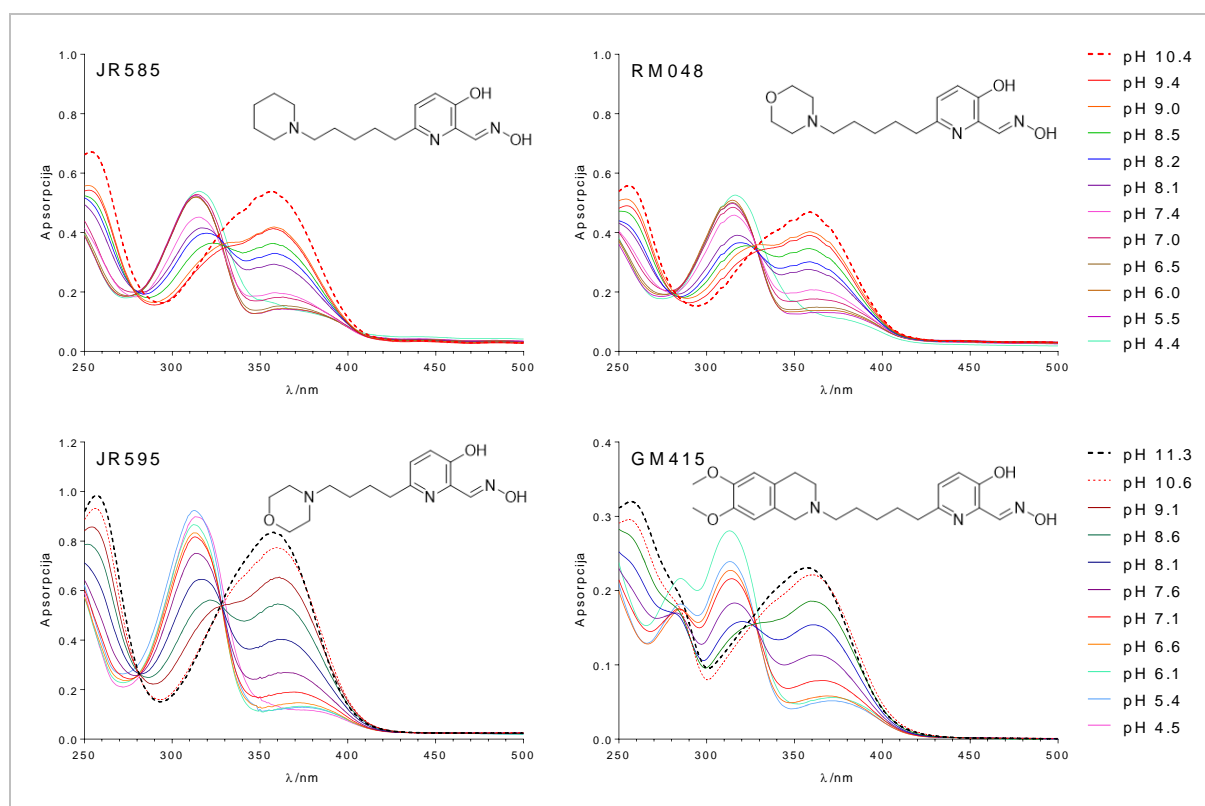
Slika 3.6. Primjer HPLC-UV DAD kromatograma: A) standardna otopina JR595 (1,475 $\mu\text{g mL}^{-1}$), te B) uzorak krvi i C) uzorak mozga miševa kojima je administriran JR595.

§ 4. REZULTATI

4.1. Hidroksipiridinski oksimi

4.1.1. Procjena nukleofilnog potencijala oksima prema pK_a oksimske skupine

Vrijednosti kiselo-bazne konstante disocijacije, odnosno pK_a vrijednosti, oksimske skupine određene su snimanjem apsorpcijskih spektara oksima (**slika 4.1**) u otopinama različitih pH. Zbog $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronskih prijelaza unutar piridinskog prstena javlja se karakteristični signal (maksimum) apsorpcijskog spektra na valnoj duljini od približno 360 nm koji odgovara deprotoniranom obliku skupina vezanih na piridinski prsten.¹⁷² Hidroksipiridinski oksimi imaju jedan piridinski prsten s oksimskom skupinom na položaju 2 i hidroksilnom skupinom na položaju 3, te je uočeno da obje skupine utječu na promjenu intenziteta signala apsorpcijskog maksimuma.



Slika 4.1. Apsorpcijski spektri hidroksipiridinskih oksima u otopinama različitih pH vrijednosti.

Iz snimljenih spektara dobivena je ovisnost apsorbancije pri karakterističnim maksimumima o koncentraciji vodikovih iona, iz kojih su pomoću jednadžbe (2) i (3), izračunate pK_{a1} i pK_{a2} vrijednosti koje pretpostavljeno odgovaraju oksimskoj, odnosno hidroksilnoj skupini. U slučaju JR595 i GM415 oksima bilo je moguće odrediti obje pK_a vrijednosti. Vrijednosti pK_{a1} hidroksipiridinskih oksima kreću se između 8,0 – 8,2 te su prema tome oksimske skupine JR585, RM048, JR595 i GM415 pri fiziološkom pH 20 %, 19 %, 17 %, odnosno 14 % u deprotoniranom obliku (**tablica 4.1**). Nedovoljna topljivost oksima GM508 je onemogućila određivanje pK_a vrijednosti njegove oksimske skupine snimanjem apsorpcijskih spektara.

Tablica 4.1. Eksperimentalno određene pK_a vrijednosti (\pm standardna pogreška) za oksimsku skupinu (=N-OH) i hidroksilnu skupinu (-OH) hidroksipiridinskih oksima pri 25 °C te udio molekula s deprotoniranom oksimskom skupinom (oksimat) pri fiziološkom pH 7,4 izračunat jednadžbom (4).

Oksim	In vitro pK_a (360 nm)		Oksimat / %
	pK_{a1}	pK_{a2}	
JR585	8,01 \pm 0,04	n.o. ^a	20
JR595	8,08 \pm 0,04	10,53 \pm 0,21	17
RM048	8,03 \pm 0,06	n.o. ^a	19
GM415	8,20 \pm 0,06	10,44 \pm 0,27	14
GM508 ^b	-	-	-

^an.o.- pK_{a2} vrijednosti nisu bile određene; ^b pK_a vrijednosti za oksim GM508 nisu određene zbog slabe topljivosti.

4.1.2. Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima

Konstanta disocijacije (K_i) kompleksa AChE ili BChE s različitim oksimima određena je mjerenjem enzimске aktivnosti kolinesteraza u prisutnost niza koncentracija supstrata ATCh i oksima. Svi oksimi su inhibirali aktivnost oba enzima u mikromolarnom području (**tablica 4.2**) što je usporedivo s K_i određenim za standardne piridinijeve oksime (pr. 2-PAM, HI-6).¹⁷³ Oba enzima imala su najveći afinitet ($K_i < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$) prema oksimu s piperidinskim prstenom, JR585, odnosno oksimu s fenil-tetrahidroizokinolinskim aromatskim sustavom, GM508. Prema ostalim oksimima enzimi su imali umjeren afinitet ($K_i = 30 - 170 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Iz odnosa K_i za AChE i BChE može se primijetiti blaga selektivnost BChE (oko 3 puta) jedino prema oksimu JR595 iako on ima isti morfolinski prsten kao oksim RM048. Stoga se može zaključiti kako je kraća poveznica oksima JR595 (četiri ugljikova atoma u odnosu na pet kod oksima RM048) omogućuje jače interakcije oksima aminokiselinama aktivnog mjesta BChE.

Tablica 4.2. Konstante disocijacije ($K_i \pm$ standardna pogreška) za komplekse AChE ili BChE s hidroksipiridinskim oksimima i piridinijevim oksimima 2-PAM i HI-6 određene koristeći navedene koncentracijske oksima pri 25 °C.

Oksim	AChE		BChE	
	Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	K_i / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	K_i / $\mu\text{mol dm}^{-3}$
JR585	0,5 – 24	$10 \pm 1,5$	5 – 30	$9,8 \pm 3,0$
JR595	2,0 – 120	135 ± 14	5 – 150	46 ± 20
RM048	67 – 133	168 ± 23	67 – 133	170 ± 15
GM415	20 – 100	$37 \pm 1,1$	20 – 100	$33 \pm 1,2$
GM508	0,5 – 8,0	$5,4 \pm 1,2$	3 – 10	$2,3 \pm 0,5$
2-PAM ^a	50 – 1000	175 ± 10	50 – 2000	390 ± 50
HI-6 ^a	10 – 200	$25,0 \pm 1,5$	100 – 1000	215 ± 10

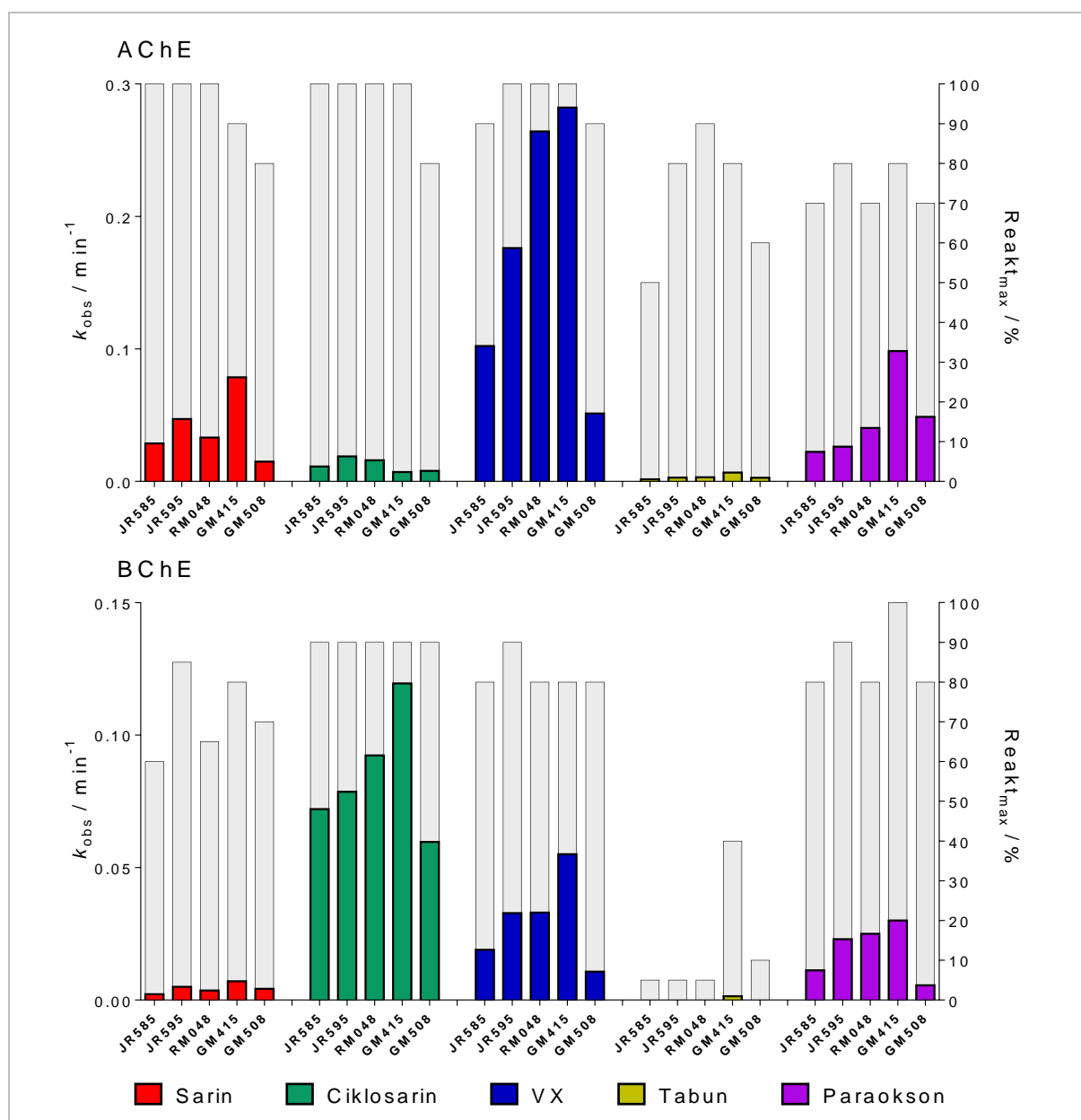
^aPodaci iz ref. 173.

4.1.3. Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima

Reaktivacija AChE i BChE fosfiliranih sarinom, VX-om, ciklosarinom, tabunom i paraoksonom testirana je pri jednoj koncentraciji oksima ($0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ kod AChE, odnosno $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ kod BChE) te su određeni maksimum povratka aktivnosti, $Reakt_{\text{max}}$, i prividna konstanta brzine reaktivacije, k_{obs} , kako je prikazano na **slici 4.2**. Općenito, hidroksipiridinski oksimi su učinkovito reaktivirali AChE inhibiranu sa svakim testiranim OP spojem. Najbrža reaktivacija inhibirane AChE s hidroksipiridinskim oksimima ostvarena je u slučaju AChE fosfilirane s VX-om, paraoksonom i sarinom. U slučaju reaktivacije inhibirane BChE, hidroksipiridinski oksimi su bili najučinkovitiji za ciklosarin, VX i paraokson, dok su brzine reaktivacije kod sarina bile niske, a kod tabuna je slaba reaktivacija uočena samo s oksimom GM415. Kako bi se definirao ukupan reaktivacijski potencijal (k_r) oksima opisan konstantom disocijacije fosfilirani enzim-oksime (tj. afinitetom pojedinog inhibiranog enzima prema oksimima), K_{OX} , te maksimalnom brzinom reaktivacije (brzina nukleofilne supstitucije), k_{+2} , ispitana je reaktivacija s nizom koncentracija oksima. Zbog slabe reaktivacije BChE inhibirane sarinom i tabunom s $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ oksimima, detaljno testiranje nije provedeno. Za procjenu reaktivacijskog potencijala hidroksipiridinskih oksima, dobiveni parametri su uspoređeni s onima za standardni oksim HI-6, ili u slučaju tabuna s rezultatima za TMB-4 koji je najučinkovitiji standardni oksim u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom.¹⁷⁴

Reaktivacija sarinom inhibiranih kolinesteraza pokazala je da su hidroksipiridinski oksimi učinkoviti u reaktivaciji inhibirane AChE, ali ne inhibirane BChE (**tablica 4.3**). Oksimi JR595, RM048 i GM415 pokazali su se najučinkovitijim hidroksipiridinskim oksimima u reaktivaciji AChE inhibirane sarinom. Oksim JR595 je ostvario najveću maksimalnu brzinu

reaktivacije, dok je afinitet AChE inhibirane sarinom bio najveći prema GM415. S druge strane, unatoč vrlo visokom afinitetu inhibirane AChE prema GM508 oksimu, on nije ostvario visoke brzine reaktivacije ($k_{+2} = 0,02 \text{ min}^{-1}$). Dodatno, maksimalna brzina reaktivacije AChE inhibirane sarinom sa standardnim oksimom HI-6 je bila najmanje tri puta brža od onih dobivenih prilikom reaktivacije s hidroksipiridinskim oksimima.



Slika 4.2. Reaktivacija AChE (gornji panel) i BChE (donji panel) inhibirane sarinom, ciklosarinom, VX-om, tabunom i paraoksonom s $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ (u slučaju AChE) i $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ (u slučaju BChE; iznimno $0,3 \text{ mmol dm}^{-3}$ oksimi kod tabuna, te $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ GM508 kod sarina) hidroksipiridinskim oksimima: vrijednost konstanta brzine reaktivacije prvog reda k_{obs} (min^{-1}) na lijevoj ordinati (stupići u boji) i vrijednost ostvarenog postotka reaktivacije na desnoj ordinati (sivi stupići).

Tablica 4.3. Reaktivacija sarinom inhibirane AChE i BChE s hidroksipiridinskim oksimima i oksimom HI-6: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (9) – (11) iz eksperimentalno dobivenih prividnih konstanti k_{obs} , te maksimalan postotak reaktivacije ($Reakt_{\text{max}}$) i vrijeme (t) u kojem je postignut. Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa izvedena pri 25 °C.

Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{+2} / min^{-1}	K_{OX} / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_r / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{min}^{-1}$	$Reakt_{\text{max}}$ / %	t / min
AChE					
JR585 (100–1000)	0,075 \pm 0,003	160 \pm 20	490 \pm 50	100	60
JR595 (50–1500)	0,29 \pm 0,03	270 \pm 90	1080 \pm 290	100	10
RM048 (100–1500)	0,12 \pm 0,01	220 \pm 60	560 \pm 130	100	30
GM415 (50–1500)	0,180 \pm 0,005	130 \pm 10	1380 \pm 60	90	15
GM508 (10–100)	0,019 \pm 0,001	20 \pm 5	1000 \pm 220	80	>300 ^a
HI-6 (5-300)	0,9 \pm 0,1	170 \pm 40	5420 \pm 780	60-90	4

^aReaktivacija nije bila gotova u označenoj vremenskoj točki.

Svi hidroksipiridinski oksimi su reaktivirali AChE inhibiranu ciklosarinom do 100 %, ali maksimalne brzine reaktivacije nisu bile veće od 0,09 min^{-1} te je ukupna konstanta brzine reaktivacije bila najmanje 70 puta niža od one dobivene u reaktivaciji s oksimom HI-6 (**tablica 4.4**). Zanimljivo je primijetiti da su hidroksipiridinski oksimi bili učinkovitiji reaktivatori inhibirane BChE nego inhibirane AChE zbog najmanje pet puta većih k_{+2} u slučaju BChE. Međutim, afinitet BChE inhibirane ciklosarinom za ove oksime bio je poprilično nizak, vjerojatno zbog većeg stupnja slobode smještanja oksima u aktivnom ždrijelu BChE koje je za 200 Å³ veće od ždrijela AChE.¹¹³

Tablica 4.4. Reaktivacija ciklosarinom inhibirane AChE i BChE hidroksipiridinskim oksimima i oksimom HI-6: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (9) – (11) iz eksperimentalno dobivenih prividnih konstanti k_{obs} , te maksimalan postotak reaktivacije ($Reakt_{\text{max}}$) i vrijeme (t) u kojem je postignut. Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa izvedena pri 25 °C.

Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{+2} / min^{-1}	K_{OX} / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_r / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{min}^{-1}$	$Reakt_{\text{max}}$ / %	t / min
AChE					
JR585 (50–500)	0,06 \pm 0,01	330 \pm 110	180 \pm 40	100	60
JR595 (100–1000)	0,09 \pm 0,01	430 \pm 130	210 \pm 40	100	45
RM048 (50–500)	0,04 \pm 0,01	120 \pm 80	320 \pm 140	100	100
GM415 (50–500)	0,020 \pm 0,006	120 \pm 100	170 \pm 90	100	120
GM508 (10–200) ^a	-	-	80 \pm 3	80	>250 ^b
HI-6 (1–50) ^a	-	-	22100 \pm 1300	100	<1
BChE					
JR585 (100–1500)	0,32 \pm 0,04	810 \pm 200	390 \pm 50	90	15
JR595 (100–1500)	0,5 \pm 0,1	790 \pm 420	610 \pm 180	90	10
RM048 (100–1500)	0,39 \pm 0,05	700 \pm 190	560 \pm 80	90	15
GM415 (50–500)	0,32 \pm 0,07	330 \pm 140	980 \pm 210	90	15
GM508 (20–200)	0,11 \pm 0,03	160 \pm 70	710 \pm 150	90	60
HI-6 (10–100) ^a	-	-	780 \pm 30	90	30

^aLinearna ovisnost k_{obs} o koncentraciji oksima; ^bReaktivacija nije bila gotova u označenoj vremenskoj točki.

Hidroksipiridinski oksimi pokazali su visok reaktivacijski potencijal u slučaju AChE inhibirane VX-om s brzinama reaktivacije do $0,7 \text{ min}^{-1}$ (**tablica 4.5**). Zbog visokog afiniteta AChE inhibirane VX-om ($K_{\text{OX}} = 10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) i relativno brze reaktivacije, oksim GM415 je pokazao izuzetno visoku ukupnu konstantu brzine reaktivacije ($30\,900 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$), dok su oksimi JR595, odnosno RM048 ostvarili najveće maksimalne brzine reaktivacije koje su dvostruko veće od brzine ostvarene u reaktivaciji s oksimom HI-6. AChE inhibirana VX-om je imala visoki afinitet i prema oksimu GM508, ali je on pokazao niske brzine reaktivacije. Učinkovitost reaktivacije BChE inhibirane VX-om s hidroksipiridinskim oksimima bila je usporediva s učinkovitošću standardnog oksima HI-6. S druge strane, učinkovitost u reaktivaciji AChE inhibirane VX-om pomoću hidroksipiridinskih oksima bila je slabija od učinkovitosti za inhibiranu BChE zbog nižih brzina reaktivacije (k_{+2}). Prije sintetizirani hidroksipiridinski oksimi s fenil-tetrahydroizokinolinskom skupinom, kakvu ima oksim GM508, pokazali su se učinkovitim reaktivatorima zbog visokog afiniteta AChE inhibirane VX-om ($K_{\text{OX}} = 6 - 47 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) i visokih brzina reaktivacije,⁴² dok su hidroksipiridinski oksimi s triptolinskim prstenom postigli brzu reaktivaciju obje kolinesteraze inhibirane VX-om.^{45,46}

Brzina nukleofilne supstitucije etil-*N,N*-dimetilfosforamidne skupine tabuna u AChE pomoću hidroksipiridinskih oksima nije bila povoljna, ali s obzirom da je riječ o konjugatu koji je poprilično rezistentan na reaktivaciju oksimima te za koji je oksim HI-6 potpuno neučinkovit, ostvarena reaktivacija s hidroksipiridinskim oksimima od 50 – 90 % predstavlja poboljšanje u odnosu na standardni oksim HI-6 (**tablica 4.6**). Oksimi JR595, RM048 i GM415 i ovdje su bili najučinkovitiji oksimi, iako su dobivene maksimalne brzine reaktivacije oko 10 puta niže nego u slučaju reaktivacije s oksimom TMB-4. U slučaju reaktivacije BChE inhibirane tabunom, hidroksipiridinski oksimi su bili potpuno neučinkoviti, osim oksima GM415 koji je pokazao tek slabu sposobnost reaktivacije. Također, ranije spomenuti hidroksipiridinski oksimi s fenil-tetrahydroizokinolinskom ili triptolinskom skupinom pokazali su se i potentnim reaktivatorima AChE inhibirane tabunom zbog visokog afiniteta, odnosno visokih maksimalnih brzina reaktivacije usporedivih s brzinama ostvarenim u reaktivaciji s oksimom TMB-4.^{42,46}

Tablica 4.5. Reaktivacija VX-om inhibirane AChE i BChE hidroksipiridinskim oksimima i oksimom HI-6: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (9) – (11) iz eksperimentalno dobivenih prividnih konstanti k_{obs} , te maksimalan postotak reaktivacije ($Reakt_{max}$) i vrijeme (t) u kojem je postignut. Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa izvedena pri 25 °C.

Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{+2} / min^{-1}	K_{OX} / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_r / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{min}^{-1}$	$Reakt_{max}$ / %	t / min
AChE					
JR585 (5–300)	$0,17 \pm 0,03$	90 ± 30	1890 ± 410	90	30
JR595 (5–500)	$0,68 \pm 0,07$	300 ± 60	2270 ± 240	100	10
RM048 (10–500)	$0,57 \pm 0,08$	120 ± 50	4900 ± 1250	100	10
GM415 (1–500)	$0,31 \pm 0,01$	10 ± 3	30900 ± 8100	100	10
GM508 (5–100)	$0,07 \pm 0,01$	30 ± 10	2310 ± 650	90	60
HI-6 (10–1000) ^a	$0,33 \pm 0,02$	60 ± 10	5740 ± 1120	90	15
BChE					
JR585 (20–300)	$0,05 \pm 0,01$	270 ± 150	180 ± 50	90	120
JR595 (20–300)	$0,10 \pm 0,04$	370 ± 240	270 ± 70	100	60
RM048 (50–1000)	$0,059 \pm 0,004$	160 ± 40	360 ± 65	80	60
GM415 (20–1000)	$0,096 \pm 0,007$	130 ± 30	760 ± 150	80	45
GM508 (20–300)	$0,020 \pm 0,002$	190 ± 40	110 ± 10	80	150
HI-6 (5–1000) ^b	$0,12 \pm 0,03$	370 ± 230	330 ± 230	85	120

^aPodaci iz ref. 175; ^bPodaci iz ref. 176.

Tablica 4.6. Reaktivacija tabunom inhibirane AChE i BChE hidroksipiridinskim oksimima i oksimima HI-6 i TMB-4: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (9) – (11) iz eksperimentalno dobivenih prividnih konstanti k_{obs} , te maksimalan postotak reaktivacije ($Reakt_{max}$) i vrijeme (t) u kojem je postignut. Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa izvedena pri 25 °C.

Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{+2} / min^{-1}	K_{OX} / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_r / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{min}^{-1}$	$Reakt_{max}$ / %	t / min
AChE					
JR585 (20–300)	$0,0033 \pm 0,0004$	110 ± 40	30 ± 5	50	400
JR595 (20–300)	$0,016 \pm 0,007$	410 ± 280	40 ± 10	80	420
RM048 (100–2000)	$0,014 \pm 0,001$	310 ± 100	45 ± 10	90	240
GM415 (10–2000)	$0,014 \pm 0,002$	140 ± 60	100 ± 40	80	210
GM508 (5–300)	$0,0029 \pm 0,0002$	$7,6 \pm 2,5$	390 ± 120	60	520
HI-6 (100–1000) ^a	-	-	-	10	24 h
TMB-4 (50–5000) ^b	$0,15 \pm 0,02$	490 ± 200	310 ± 130	100	20
BChE					
JR585 (300) ^a	-	-	-	< 10	24 h
JR595 (300) ^a	-	-	-	< 10	24 h
RM048 (300) ^a	-	-	-	< 20	24 h
GM415 (300–2000)	$0,004 \pm 0,001$	540 ± 290	$7,9 \pm 2,8$	40	24 h
GM508 (300) ^a	-	-	-	< 25	24 h
HI-6 (1000–3000) ^c	$0,0016 \pm 0,0004$	1800 ± 1000	$0,91 \pm 0,57$	25	18 h

^aParametri nisu određeni zbog slabog reaktivacijskog potencijala; ^bReaktivacija ljudske eritrocitne AChE, Podaci iz ref. 56;

^cPodaci iz ref. 177.

Hidroksipiridinski oksimi, točnije JR595, RM048 i GM415, su se pokazali učinkovitijim reaktivatorima AChE inhibirane paraoksonom od standardnog oksima HI-6, zbog 10 – 15 puta većih maksimalnih brzina reaktivacije. Međutim, afinitet AChE inhibirane paraoksonom je bio poprilično nizak za hidroksipiridinske oksime, osim u slučaju oksima GM508 ($K_i = 30 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Međutim, u odnosu na druge hidroksipiridinske oksime, on je najsporije reaktivirao AChE inhibiranu paraoksonom. U slučaju reaktivacije BChE inhibirane paraoksonom s oksimom JR595, maksimalna brzina reaktivacije bila je i do 22 puta veća u odnosu na brzine s oksimom HI-6, ali je afinitet inhibirane BChE prema JR595 bio iznimno nizak ($K_i > 1 \text{ mmol dm}^{-3}$). Inhibirana BChE je imala viši afinitet prema oksimima RM048 i GM415, ali su k_{+2} bile najmanje dva puta niže nego u reaktivaciji s JR595.

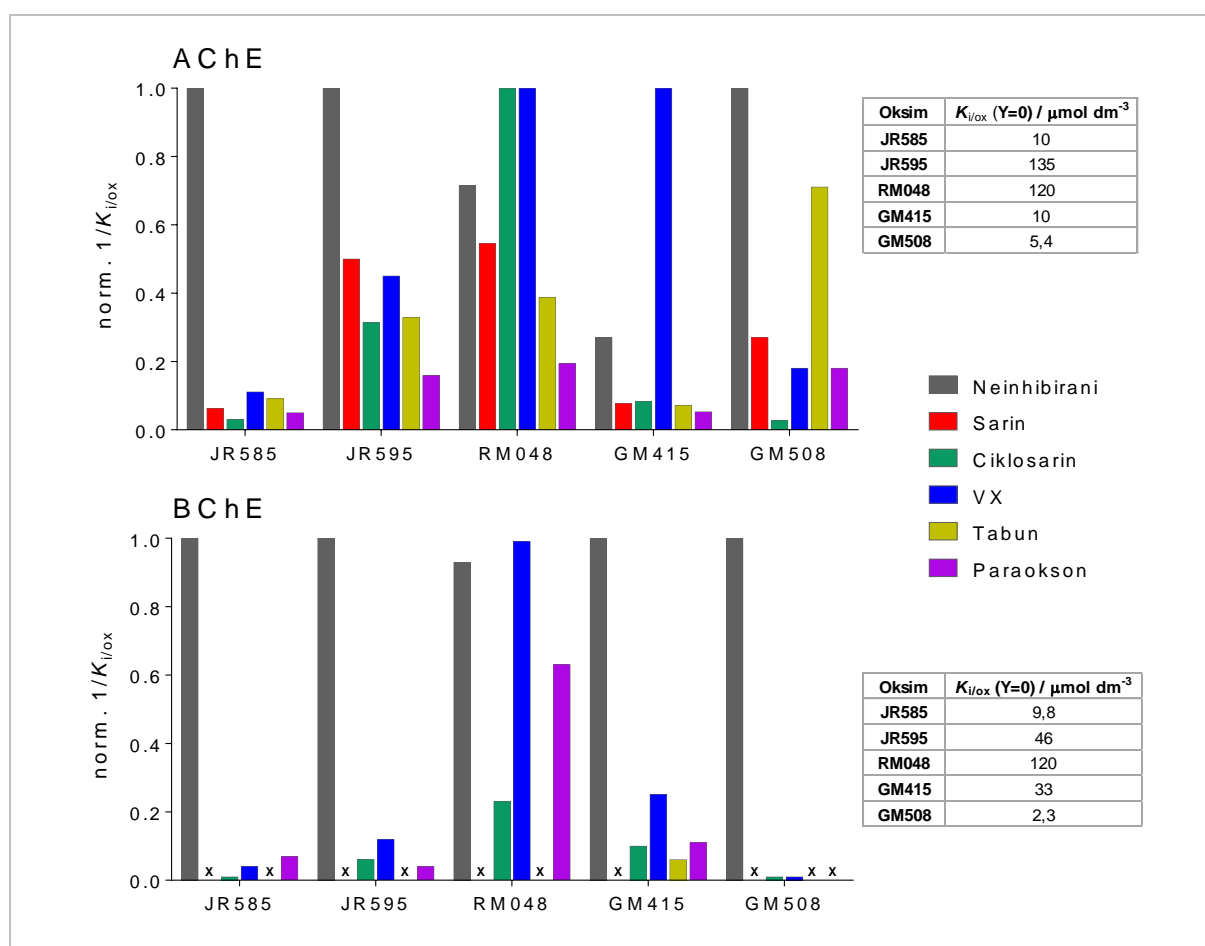
Tablica 4.7. Reaktivacija paraoksonom inhibirane AChE i BChE hidroksipiridinskim oksimima i oksimom HI-6: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (9) – (11) iz eksperimentalno dobivenih prividnih konstanti k_{obs} , te maksimalan postotak reaktivacije ($Reakt_{\text{max}}$) i vrijeme (t) u kojem je postignut. Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa izvedena pri 25 °C.

Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{+2} / min^{-1}	$K_{\text{OX}} / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_r / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$	$Reakt_{\text{max}} / \%$	t / min
AChE					
JR585 (20–300)	$0,07 \pm 0,02$	200 ± 110	340 ± 100	70	30
JR595 (20–1500)	$0,36 \pm 0,03$	850 ± 150	430 ± 40	80	10
RM048 (50–2000)	$0,27 \pm 0,03$	620 ± 180	440 ± 80	80	15
GM415 (20–2000)	$0,24 \pm 0,02$	190 ± 70	1300 ± 350	80	10
GM508 (20–300)	$0,058 \pm 0,006$	30 ± 10	1800 ± 600	80	30
HI-6 (100–1500)	$0,026 \pm 0,001$	590 ± 50	$50 \pm 2,2$	90	170
BChE					
JR585 (20–300)	$0,020 \pm 0,003$	140 ± 40	140 ± 30	90	270
JR595 (20–1500)	$0,15 \pm 0,02$	1160 ± 310	130 ± 20	90	40
RM048 (50–1000)	$0,056 \pm 0,006$	250 ± 80	230 ± 50	100	90
GM415 (20–1000)	$0,075 \pm 0,01$	290 ± 110	260 ± 70	100	90
GM508 (20–300)	$0,023 \pm 0,008$	640 ± 280	35 ± 4	80	270
HI-6 (100–1500)	$0,0068 \pm 0,0004$	450 ± 70	15 ± 2	80	500

4.1.4. Afinitet različitih konjugata enzima prema oksimima te molekulsko modeliranje

Kako bi se pobliže analizirao utjecaj strukturnih razlika oksima na afinitet AChE (neinhibirane ili inhibirane OP spojem) određene konstante disocijacije enzima i oksima stavljene su u odnose kako je prikazano na slici 4.3. Afinitet AChE prema oksimima JR585, JR595 i GM508 je najveći kada je enzim neinhibiran i značajno pada u slučajevima kada je enzim inhibiran s jednim od OP spojeva. Visok afinitet kojeg ima neinhibirana AChE prema GM508 relativno je zadržan jedino kod AChE inhibirane tabunom. U slučaju oksima GM415 i RM048, afinitet

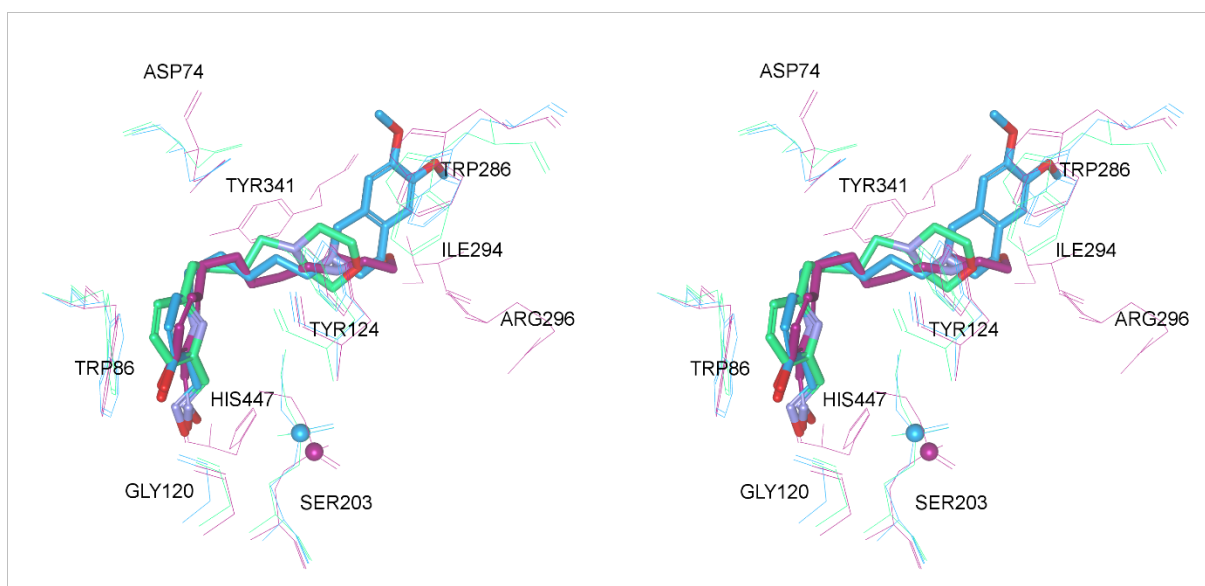
AChE inhibirane VX-om, odnosno VX-om i ciklosarinom, bio je veći od afiniteta neinhibirane AChE. Općenito, najmanji afinitet enzima AChE pokazan je prema oksimima JR595 i RM048, dok je najveći afinitet AChE pokazan prema oksimu GM508. U slučaju BChE, inhibirani enzim je imao bitno niži afinitet prema oksimima od neinhibiranog enzima, osim u slučaju oksima RM048 za koji su afiniteti BChE inhibirane VX-om i afinitet neinhibiranog enzima bili slični. Veći afinitet inhibiranog enzima u odnosu na afinitet neinhibiranog enzima cilj je u dizajnu oksimskih reaktivatora kako bi se izbjegla moguća inhibicija reaktiviranog enzima samim oksimom. U tom smislu oksimi RM048 i GM415 predstavljaju moguće modele za buduća istraživanja koja bi dala određene smjernice za sintezu reaktivatora za koje bi inhibirani enzimi (s ciklosarinom i/ili VX-om) pokazivali veću selektivnost od neinhibiranog enzima.



Slika 4.3. Usporedba afiniteta AChE (gornji panel) i BChE (donji panel) za pojedini hidrosipiridinski oksim kada je enzim neinhibiran, odnosno inhibiran sarinom, ciklosarinom, VX-om, tabunom ili paraoksonom. Vrijednosti normalizirane prema najvećem afinitetu ($1/K_{i/ox}$) enzima za oksim (odgovarajuće vrijednosti konstante disocijacije prikazane u tablici).

Nadalje, kako bi predvidjeli orijentaciju oksima i interakcije između oksima i aminokiselina u ždrijelu enzima korištene su računalne metode molekuskog pristajanja tri najpotentnija

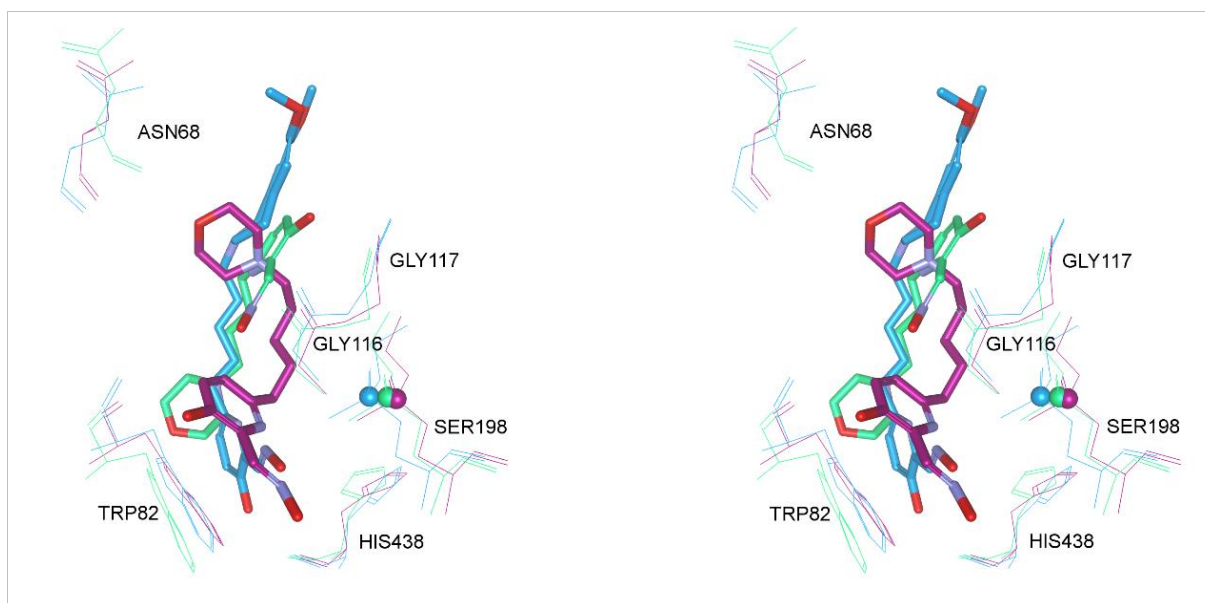
reaktivatora (JR595, RM048 i GM415) u kristalne strukture enzima. Sva tri hidroksipiridinska oksima su u slučaju reaktivacije AChE inhibirane VX-om ostvarili visoke maksimalne brzine reaktivacije uz niske i umjerene K_{OX} vrijednosti (vidi **tablicu 4.5**) stoga su za početak modelirani kompleksi ta tri oksima s AChE inhibiranom VX-om te je njihova superpozicija prikazana na **slici 4.4**. Unutar ždrijela AChE inhibirane VX-om, sva tri oksima se vežu u izduljenoj konformaciji s piridinskim prstenom smještenim na dnu ždrijela u katalitičkom mjestu te preko njega ostvaruju π - π i/ili π -sigma interakcije s Trp86 u kolinskom mjestu enzima i takva interakcija je prethodno zabilježena u kristalnim strukturama kolinesteraza u kompleksu s takrinskim derivatima.^{10,178,179} Iako je udaljenost između oksimske skupine i atoma fosfora OP spoja blizu one optimalne od 4 – 5 Å¹⁸⁰ za nukleofilni napad oksima na atom fosfora, orijentacija oksimske skupine nije optimalna za *in line* nukleofilni napad, tj. ne prilazi atomu fosfora pod kutom od ~ 180° u odnosu na izlaznu skupinu.^{180,181}



Slika 4.4. Stereoskopski prikaz superpozicije modeliranih kompleksa između AChE inhibirane VX-om (PDB:2Y2U) i oksima JR595 (zeleni), RM048 (ljubičasti) i GM415 (plavi). Ostatak VX-a vezanog za serin je istaknut kuglastim prikazom fosfora.

Uočeno je da jako slične konformacije ovih triju oksima ostvaruju različite interakcije unutar ždrijela konjugata VX-AChE. JR595 formira vodikovu vezu između svog morfolinskog prstena i Tyr124 ostatka perifernog mjesta, dok GM415 i RM048 formiraju vodikove veze između hidroksilne skupine na piridinskom prstenu i Gly120 ostatka oksianionske šupljine. RM048 formira dodatne vodikove veze između oksimske skupine i His447 te između kisika u morfolinskom prstenu i Ile294. U literaturi je pokazano da His447 ima ulogu u odvlačenju vodika iz oksimske skupine što povećava nukleofilnost oksimske skupine.¹⁸² Dvije metilenske

skupine oksima RM048, tj. metilenska skupina susjedna kisiku morfolinskog prstena i metilenska skupina vezana na morfolinski prsten, formiraju vodikove veze s Arg296, odnosno Tyr124 ostatkom. Također, jedna metilenska skupina iz poveznice oksima RM048 stvara π -sigma interakciju s Tyr341 ostatkom. Za razliku od JR595 i RM048, oksim GM415 ima tetrahidroizokinolinsku skupinu koja omogućava interakcije s Trp286 perifernog mjesta što može objasniti 10, odnosno 30 puta veći afinitet VX-AChE konjugata prema GM415 u odnosu na afinitete prema RM048, odnosno JR595. Slične interakcije zabilježene su i u kristalnim strukturama kolinesteraza s oksimom HI-6 i ostalim oksimima.^{128,183}



Slika 4.5. Stereoskopski prikaz superpozicije modeliranih kompleksa između BChE (PDB: 2PM8) inhibirane VX-om i oksima JR595 (zeleni), RM048 (ljubičasti) i GM415 (plavi). Ostatak VX-a vezanog za serin je istaknut kuglastim prikazom fosfora.

Budući da je reaktivacija BChE inhibirane VX-om s JR595, RM048 i GM415 bila 3 – 10 puta sporija u odnosu na reaktivaciju AChE inhibirane VX-om, dodatno su napravljeni modeli kompleksa ova tri oksima s kristalnom strukturom BChE inhibirane VX-om te je njihova superpozicija prikazana na **slici 4.5**. Uočene su značajne razlike u orijentaciji triju oksima, kao i u broju interakcija u odnosu na modele kompleksa s AChE inhibirane VX-om. Piridinski prsten oksima RM048 i GM415 je pozicioniran unutar katalitičkog mjesta s oksimskom skupinom usmjerenom prema dnu aktivnog mjesta, dok je tetrahidroizokinolinski dio GM415 oksima smješten unutar perifernog mjesta, a morfolinski prsten oksima RM048 odmah ispod perifernog mjesta. Međutim, oksimi GM415 i RM048 su zauzeli različite dijelove aktivnog mjesta, tako da se oksim GM415 smjestio blizu zida aktivnog ždrijela, dok se oksim RM048 smjestio po sredini ždrijela. Oksim JR595 zauzima isti dio ždrijela kao oksim GM415, ali s

piridinskim prstenom orijentiranim prema otvoru aktivnog ždrijela s oksimskom skupinom udaljenom od atoma fosfora OP spoja, dok se morfolinski prsten smjestio blizu kolinskog veznog mjesta BChE. Od ova tri oksima, jedino GM415 ostvaruje π - π interakcije između piridinskog prstena i Trp82 kolinskog veznog mjesta koja je u literaturi istaknuta kao interakcija bitna za specifično vezanje s BChE.¹⁸⁴ Međutim, selektivnost BChE prema GM415 nije vidljiva u *in vitro* određenim K_{OX} vrijednostima (vidi **tablicu 4.5**). Dodatno, u kompleksima BChE inhibirane VX-om s oksimima GM415 i RM048 predviđeno je formiranje vodikovih veza između hidroksilne skupine njihovog piridinskog prstena i aminokiseline His438 za oksim GM415, odnosno karbonilnog kisika Trp82 za oksim RM048.

Ove razlike u vezanju i smještanju oksima u enzimima inhibiranim VX-om mogu objasniti razlike u K_{OX} vrijednostima koje su kod AChE niže (10 – 30 puta) za oksim GM415 u odnosu na oksime JR595 i RM048 zbog stabilizacije GM415 u perifernom mjestu AChE enzima; te interakcije nema u BChE enzimu koji umjesto Trp286 ima Ala277 te je K_{OX} samo dva puta niži za GM415 u odnosu na K_{OX} za JR595, i usporediv s onim za RM048. Iako su u reaktivaciji AChE uočene vrlo visoke brzine nukleofilne supstitucije, rezultati molekuskog pristajanja ne daju objašnjenje za tu opservaciju, što potvrđuje u kojoj mjeri inhibirani enzim, kao ni oksim, nisu statične komponente, tj. da dinamika sustava ima važnu ulogu u reaktivaciji.^{39,185}

4.1.5. Fizikalno-kemijska svojstva oksima

Vjerojatnost prolaska hidroksipiridinskih oksima kroz KMB-u može se procijeniti analizom njihovih fizikalno-kemijskih svojstava te njihovom usporedbom s preporučenim vrijednostima tih svojstava za lijekove koji imaju djelovanje u SŽS-u.¹⁵³ Fizikalno-kemijska svojstva, koja opisuju veličinu, polarnost i fleksibilnost oksima, su prikazana u **tablici 4.8**.

Tablica 4.8. Vrijednosti fizikalno-kemijska svojstva hidroksipiridinskih oksima određena *in silico* i preporuka gornjih granica tih vrijednosti za lijekove s djelovanjem u SŽS-u: molarna masa (M), područje ukupne polarne površine (TPSA), broj donora i akceptora vodikove veze (HBD i HBA) te broj veza koje se rotiraju (RB).

Oksim	M / g mol ⁻¹	TPSA ^a / Å ²	HBD ^a	HBA ^a	RB
JR585	291,39	68,95 (70,15)	2 (3)	5 (4)	7
JR595	279,34	78,18 (79,38)	2 (3)	6 (5)	6
RM048	293,37	78,18 (79,38)	2 (3)	6 (5)	7
GM415	399,49	87,41 (88,61)	2 (3)	7 (6)	9
GM508	518,66	90,65 (94,68)	2 (2)	8 (6)	11
Preporuke ^b	< 450	< 60 – 70	< 3	< 7	< 8

^aVrijednosti TPSA, HBD, HBA u zagradi predstavljaju vrijednosti pri pH 7,4; ^bPreporuke iz ref. 153.

Iz toga proizlazi da većina hidrokspiridinskih oksima, osim GM508, ima optimalnu vrijednost molarna mase ($M = 280 - 400 \text{ g mol}^{-1}$) dok je vrijednost ukupnog područja polarne površine svih oksima ($TPSA = 70 - 95 \text{ \AA}^2$) na granici ili iznad preporučenih vrijednosti uz povoljan broj heteroatoma koji predstavljaju donore vodikovih veza ($HBD = 2 - 3$), odnosno heteroatoma koji služe kao akceptori vodikovih veza ($HBA = 4 - 7$). Također, fleksibilnost oksima JR585, JR595 i RM048 je optimalna ($RB = 6$ ili 7). Jedino oksim GM508 ima veći broj svojstava čije su vrijednosti iznad preporučenih za molekule s djelovanjem u SŽS-u. Također oksim GM415 ima veći broj veza koje rotiraju (9) od preporučenog broja (8). Veća fleksibilnost oksima GM415 i GM508 u usporedbi s ostalim hidrokspiridinskim oksimima proizlazi iz njihovog tetrahidroizokinolinskog aromatskog sustava.

Nadalje, bitna fizikalno-kemijska karakteristika molekula za prolaz kroz membrane je njihov naboj te je poznato da nabijene molekule prolaze kroz membranu sporije nego nenabijene. Naboj molekula ovisi o ionizacijskom stanju funkcionalnih skupina unutar molekule te se međusobno iste molekule s različitim ionizacijskim stanjem barem jedne funkcionalne skupine nazivaju mikrospecijama. Stoga, hidrokspiridinski oksimi, koji imaju tri skupine podložne ionizaciji, odnosno četiri u slučaju oksima GM508, mogu imati 14 – 19 različitih mikrospecija u cijelom rasponu pH (0 – 14). Prema *in silico* određenim pK_a vrijednostima (**tablica 4.9**), samo se dvije funkcionalne skupine mogu smatrati biorelevantnim, odnosno samo dvije skupine će imati i određeni udio ioniziranih oblika pri fiziološkom pH 7,4. To su oksimska skupina i tercijarni dušikov atom unutar supstituenta vezanog na piridinski prsten.

Tablica 4.9. *In silico* određene pK_a vrijednosti oksimske skupine (=N-OH) i hidroksilne skupine (-OH) vezane na piridinski prsten, dušika piridinskog prstena ($R=N-R'$) te tercijarnog amina u supstituentu (R_3-NH^+) hidrokspiridinskih oksima, te sukladno tome udio potpuno neioniziranih molekulskih vrsta oksima pri pH 7,4.

Oksim	<i>In silico</i> određena pK_a				Udio neioniziranog oblika oksima / %
	=N-OH	-OH	R=N-R'	R_3-NH^+	
JR585	8.10	9.82	3.41	10.49	0,2
JR595	8.33	10.33	3.29	7.32	30
RM048	8.37	10.33	3.41	7.50	22
GM415	8.52	10.33	3.44	7.89	9
GM508 ^a	10.34	8.90	3.35	7.82	4

^aOksim GM508 ima dodatnu skupinu koja je podložna ionizaciji: tercijarni dimetil amin (*in silico* pK_a je 4,17).

Eksperimentalne (vidi **tablicu 4.1**) i *in silico* određene pK_a vrijednosti oksimske skupine međusobno se razlikuju za oko 0,09 – 0,32 pH jedinice te se može zaključiti, uzimajući u obzir sve faktore koji mogu utjecati i na eksperimentalno određene i izračunate pK_a vrijednosti, da je

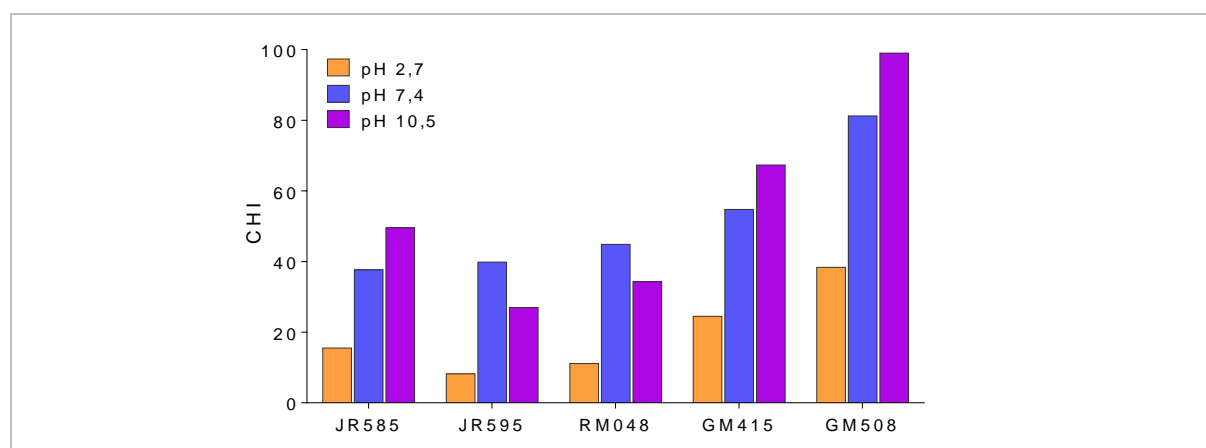
algoritam računalnog programa ChemAxon's Marvin primjenjiv za *in silico* procjenu pK_a vrijednosti oksimske skupine hidroksipiridinskih oksima. Glavna mikrospecija hidroksipiridinskih oksima koja prevladava pri fiziološkom pH jest mikrospecija s protoniranom tercijarnom skupinom i protoniranom oksimskom skupinom. Najveći udio neioniziranih mikrospecija pri fiziološkom pH ostvaruju oksimi JR595 (30 %) i RM048 (22 %), dok ostali oksimi imaju < 9 % neioniziranih mikrospecija.

Tablica 4.10. Koeficijenti lipofilnosti ($\log P^a$ i $\log D_{7,4}^b$) određeni *in silico* te eksperimentalno određen Chrom $\log D_{7,4}$ hidroksipiridinskih oksima i tercijarnih oksima MINA i DAM.

Oksim	$\log P^a$	$\log D_{7,4}^b$	Chrom $\log D_{7,4}$
JR585	3,14 (1,97)	2,33	1,23
JR595	1,62 (1,18)	1,01	1,41
RM048	2,07 (1,58)	1,5	1,85
GM415	3,74 (3,03)	2,98	2,69
GM508	5,63 (4,73)	4,98	4,96
MINA	0,21	-0,99	<-0,32
DAM	0,40	-0,53	0,22

^a*In silico* $\log P$ vrijednost određena za nenabijenu molekulsku vrstu (u zagradi je $\log P$ pri pH koji je jednak izoelektričnoj točki pl); ^bProcjena *in silico* $\log D_{7,4}$ vrijednosti ovisi o *in silico* određenim pK_a vrijednostima.

Lipofilnost spoja se može prikazati kao koeficijent raspodjele spoja između organskog otapala i vode, $\log P$. U **tablici 4.10** prikazane su *in silico* predviđene $\log P$ vrijednosti te koeficijent lipofilnosti pri pH 7,4 ($\log D_{7,4}$), kao i kromatografski određen koeficijent lipofilnosti pri pH 7,4 (Chrom $\log D_{7,4}$) hidroksipiridinskih oksima. Eksperimentalno određeni koeficijenti lipofilnosti su potvrdili da su znatno veću lipofilnost hidroksipiridinskih oksima u odnosu na standardne oksime (2-PAM, HI-6, obidoksim) za koje je Chrom $\log D_{7,4}$ bio < -0,32. *In silico* određeni $\log D$ dobro se slaže s eksperimentalno određenim vrijednostima.



Slika 4.6. Kromatografski određene vrijednosti indeksa hidrofobnosti (CHI) pri kiselom (2,7), neutralnom (7,4) i bazičnom (10,5) pH koje govore o kiselobaznom karakteru hidroksipiridinskih oksima.

Hidroksipiridinski oksimi pokazali su se lipofilnijima i od oksima DAM i MINA. Određivanjem Chrom log*D* (indeksa hidrofobnosti, CHI) u otopinama različitih pH vrijednosti (pH 2,7, pH 7,4 i pH 10,5) bilo je moguće odrediti kiselo-bazni karakter oksima (**slika 4.6**). Pokazano je da oksimi JR585, GM415 i GM508 imaju karakter jake baze, a oksimi JR595 i RM048 amfifilni karakter.

4.1.6. Citotoksičnost oksima i indukcija oksidacijskog stresa u staničnim linijama

Za testiranje toksičnog potencijala u staničnim linijama, odabrani su najučinkovitiji reaktivatori iz skupine hidroksipiridinskih oksima (JR595, RM048 i GM415) te je ispitan njihov citotoksični potencijal mjerenjem metaboličke aktivnosti stanica u staničnim linijama neuroblastoma (SH-SY5Y), astrocitoma (1321N1), hepatocita (HepG2) i nefrocita (PK-15) koristeći MTS test (**slika 4.7**), kao i njihova sposobnost da induciraju stvaranje ROS vrsta u staničnim linijama neuroblastoma i astrocitoma (**slika 4.8**). Hidroksipiridinski oksimi nisu se pokazali značajno toksičnima ni za jednu staničnu liniju u testiranom koncentracijskom rasponu (do 500 ili 800 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), osim oksima GM415 koji je pokazao toksičan učinak za stanice neuroblastoma i nefrocite već pri koncentraciji od 160 odnosno 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (**tablica 4.11**). Standardni oksimi, 2-PAM i HI-6, su testirani za usporedbu te njihova citotoksičnost nije uočena ni u jednoj staničnoj liniji u koncentracijama $\leq 800 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

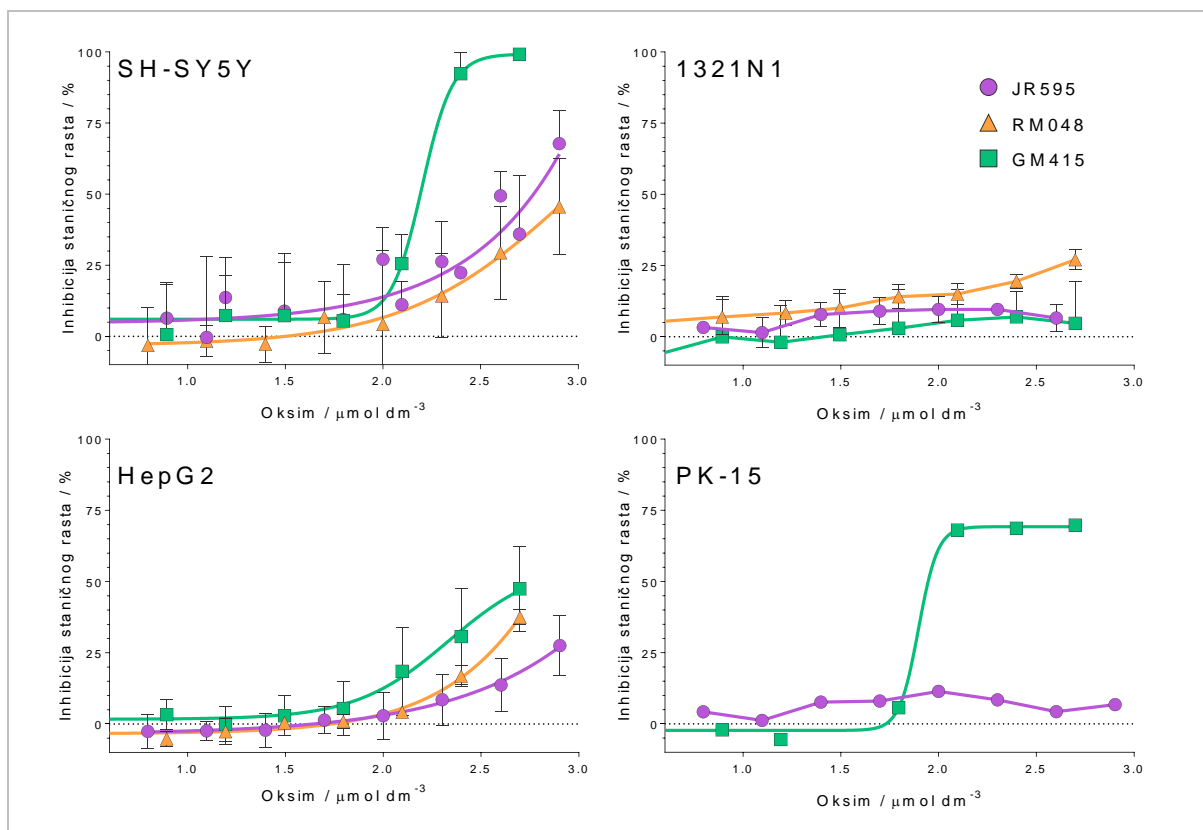
Tablica 4.11. Citotoksičnost oksima JR595, RM048 i GM415 prikazana kao IC_{50} vrijednosti za 24-satni tretman staničnih linija neuroblastoma SH-SY5Y, astrocitoma 1321N1, hepatocita HepG2 i nefrocita PK-15.

Oksim	$IC_{50}^a / \mu\text{mol dm}^{-3}$			
	SH-SY5Y	1321N1	HepG2	PK-15
JR595	> 800 (800)	> 800 (800)	> 800 (800)	> 800 (800)
RM048	> 800 (800)	> 500 (500)	> 500 (800)	-
GM415	160 (800)	> 500 (500)	> 500 (500)	~ 100 (500)

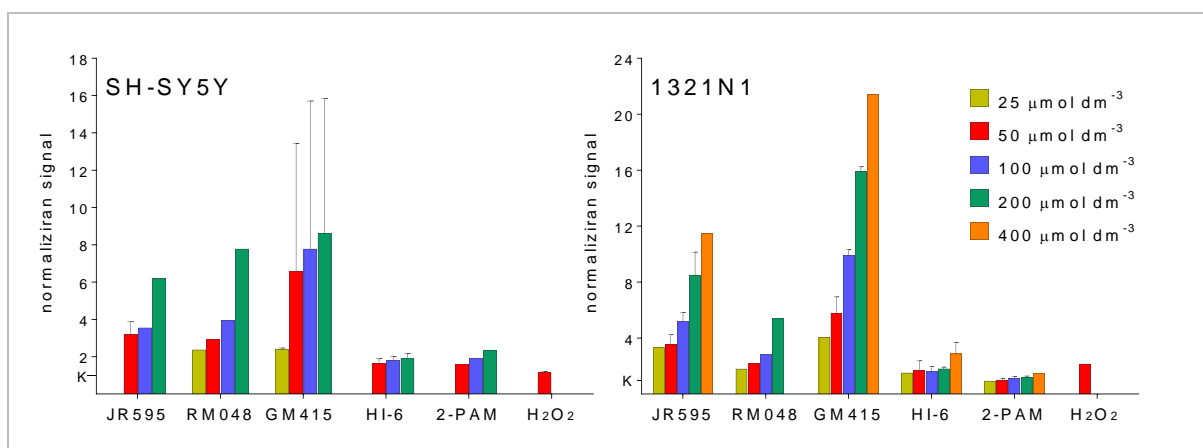
^aU zagradi je naznačena maksimalna testirana koncentracija oksima.

Uslijed tretmana neuroblastoma i astrocitoma s hidroksipiridinskim oksimima (JR595, RM048 i GM415) uočeno je povećanje indukcije ROS vrsta u odnosu na kontrolne netretirane stanice i stanice tretirane standardnim oksimima ovisno o koncentraciji (**slika 4.8**). Najznačajnija indukcija oksidacijskog stresa u obje testirane stanične linije uočena je prilikom tretmana stanica s oksimom GM415 u odnosu na netretirane stanice. Oksimi JR595 i RM048 izazvali su sličan profil indukcije oksidacijskog stresa ovisan o koncentraciji oksima u obje stanične linije, te su pri nižim koncentracijama (do 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) pokazali indukciju približno 4 – 6 puta veću u odnosu na onu u netretiranim stanicama. H_2O_2 je, kao predstavnik ROS vrste, služio kao

pozitivna kontrola i pri koncentraciji H_2O_2 od $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ izazvao je 2 – 3 puta veći signal od signala dobivenog za netretirane stanice.



Slika 4.7. Inhibicija staničnog rasta (%) stanične linije neuroblastoma (SH-SY5Y), astrocitoma (1321N1), hepatocita (HepG2) i nefrocita (PK-15) uslijed 24-satnog tretmana s oksimima JR595, RM048 i GM415.



Slika 4.8. Indukcija oksidacijskog stresa u staničnoj liniji neuroblastoma (SH-SY5Y) ili astrocitoma (1321N1) nakon 4-satnog tretmana oksimima JR595, RM048 i GM415 te standardnim oksimima HI-6 i 2-PAM, odnosno H_2O_2 spojem kao ROS vrstom (pozitivna kontrola). Vrijednosti na ordinati odgovaraju indukciji oksidacijskog stresa pri različitim koncentracijama pojedinog oksima i normalizirane su prema indukciji ROS vrsta u netretiranim stanicama ($K=1$).

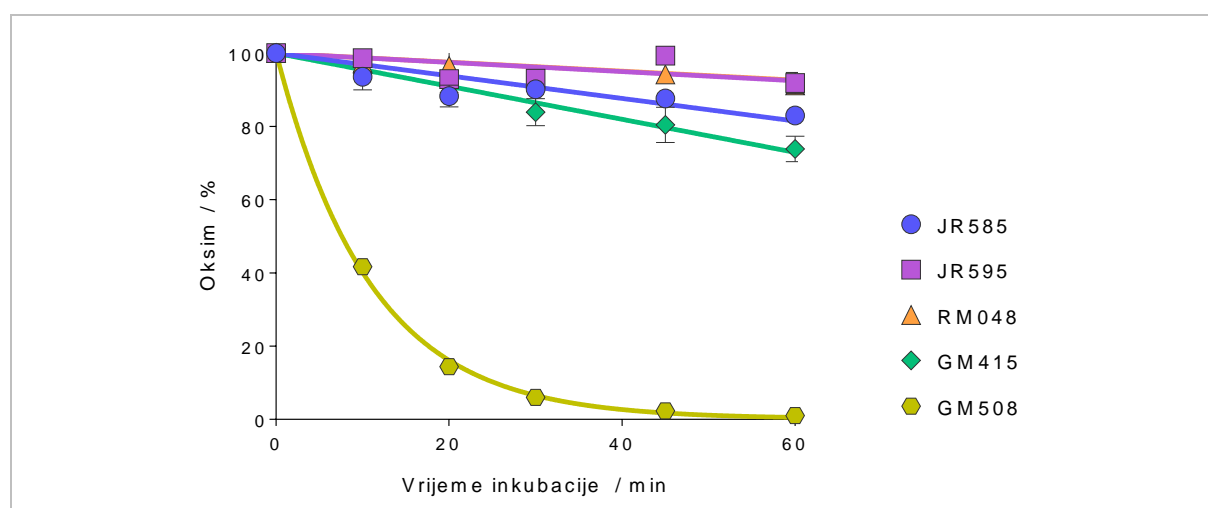
4.1.7. Metabolička stabilnost oksima uslijed inkubacije s mikrosomima

Kako bi se testiralo jesu li hidrokspiridinski oksimi kao lipofilni spojevi podložni metaboličkoj razgradnji CYP450 enzimima, određena je njihova stabilnost prilikom inkubacije s ljudskim jetrenim mikrosomima koji sadrže te enzime. Prema poluvremenima metaboličke razgradnje, hidrokspiridinski oksimi su svrstani u tri kategorije metaboličke stabilnosti prema procijenjenom *in vivo* hepatičkom klirensu (**tablica 4.12**). Oksimi JR595 i RM048 spadaju u kategoriju metabolički stabilnih spojeva, JR585 i GM415 u kategoriju umjereno metabolički stabilnih spojeva, dok je GM508 izuzetno metabolički nestabilan i potpuno se razgrađuje unutar 60 minuta. Njihova razgradnja s mikrosomima tijekom vremena je prikazana na **slici 4.9**. Metabolička stabilnost oksima JR595 potvrđena je i prilikom inkubacije s mišjim mikrosomima (**tablica 4.12**) budući da je JR595 odabran za daljnje testiranje *in vivo* u miševima.

Tablica 4.12. Metabolička stabilnost hidrokspiridinskih oksima uslijed inkubacije s ljudskim mikrosomima: poluvrijeme razgradnje spoja ($t_{1/2}$), vrijednosti intrinzičnog klirensa (Cl_{int}) i *in vivo* hepatičkog klirensa (LBF) izračunate jednadžbama (15) i (16) te kategorija klirensa.

Oksim	$t_{1/2}$ / min	Cl_{int} / $\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	LBF / %	Kategorija klirensa
JR585	205	6,7	30	Umjeren
JR595 ^a	560 (285)	< 6,7 (< 12,5)	14 (15)	Nizak
RM048	650	<6,7	14	Nizak
GM415	140	10,2	39	Umjeren
GM508	7,6	182,2	92	Visok

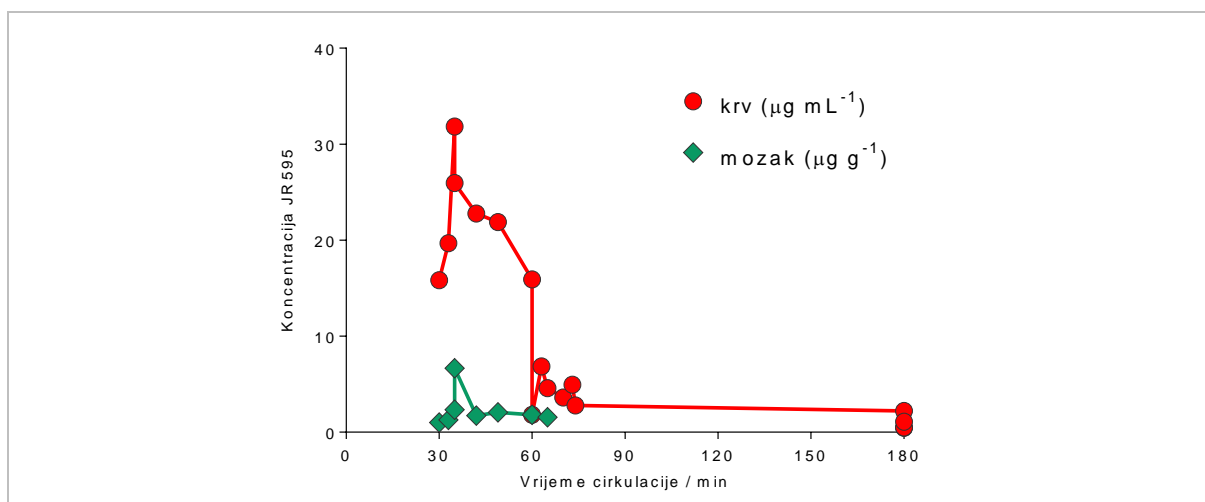
^aU zagradi vrijednosti određene prilikom inkubacije s mišjim mikrosomima.



Slika 4.9. Ovisnost koncentracije hidrokspiridinskih oksima o vremenu inkubacije s ljudskim mikrosomima.

4.1.8. Koncentracije oksima JR595 u krvi i mozgu tretiranih miševa

Temeljem svih prethodnih ispitivanja odabran je JR595 kao vodeći oksim skupine hidroksipiridinskih oksima, te je s njim provedeno dodatno ispitivanje *in vivo* u miševima soja CD-1 kako bi se odredilo prolazi li nosivost kroz KMB-u. Spoj JR595 je apliciran intramuskularno (*i.m.*) u dozi od 100 mg kg^{-1} nakon čega miševi nisu pokazali nikakve znakove toksičnosti u praćenom vremenu (3 sata). U svim uzorcima krvi je uspješno određena masena koncentracija spoja JR595 između 30. i 180. minute cirkulacije. Maksimalna masena koncentracija JR595 u krvi ($31,83 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) određena je kod miša (br. 3) žrtvovanog nakon 35 minuta. Točnu masenu koncentraciju oksima JR595 u mozgu bilo je moguće odrediti samo za 8 od ukupno 17 uzoraka zbog slabe osjetljivosti metode. Maksimalna masena koncentracija JR595 u mozgu ($6,66 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) određena je u uzorku miša (br. 4) također žrtvovanog nakon 35 minuta. Na **slici 4.10** je prikazana ovisnost masene koncentracije spoja JR595 u krvi ($\mu\text{g mL}^{-1}$) i mozgu ($\mu\text{g g}^{-1}$ mozga) o vremenu proteklom od trenutka aplikacije. Maksimalna masena koncentracija oksima JR595 u krvi ($\sim 30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) odgovara molarnoj koncentraciji $\sim 100 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$. Prema vrijednostima maksimalno ostvarenih koncentracija JR595 spoja u krvi i mozgu (vrijeme cirkulacije od 30.-35. minute) određeno je da u mozak prelazi od 6 – 26 % koncentracije JR595 određenih u krvi svake životinje zasebno. **Tablica 4.13** prikazuje određene vrijednosti koncentracija u krvi i mozgu za pojedinog miša i druge podatke relevantne za obradu podataka. LC-MS analizom u laboratoriju Fidelta d.o.o., Zagreb, je potvrđena ispravnost postupka obrade i analize uzorka u svrhu određivanja koncentracije JR595 u biološkim uzorcima krvi i mozga (nije prikazano).



Slika 4.10. Koncentracije oksima JR595 određene u krvi i mozgu miševa žrtvovanih nakon vremena prikazanog na apscisi, a koje je proteklo od *i.m.* aplikacije 100 mg kg^{-1} JR595.

Tablica 4.13. Podaci o tjelesnoj masi ($m_{\text{miš}}$) i masi mozga (m_{mozak}) miševa te masene koncentracije JR595 spoja određene u krvi (γ_{krv}) i mozgu (γ_{mozak}) nakon navedenih vremena cirkulacije t .

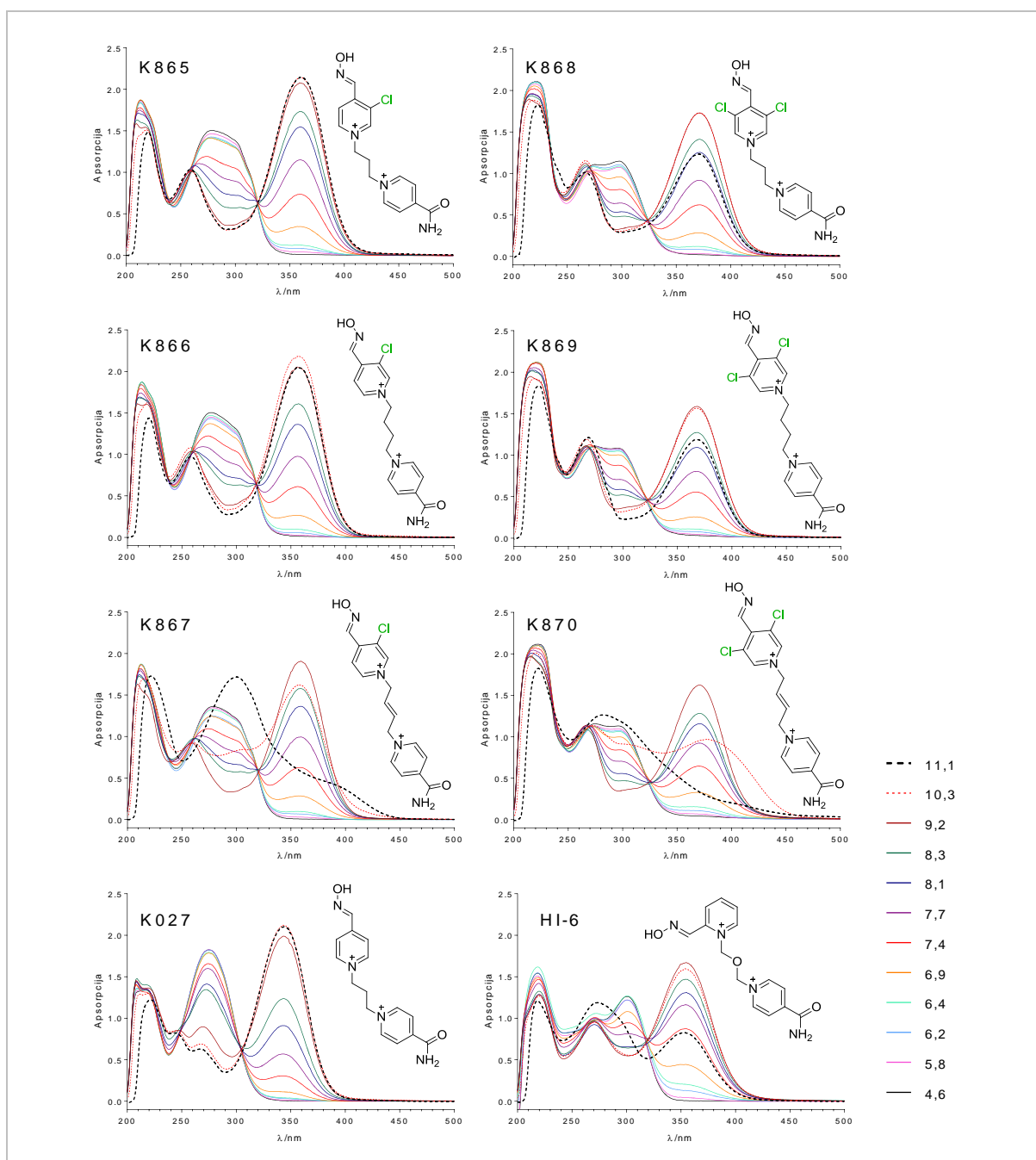
Miš	t / min	$m_{\text{miš}}$ / g	m_{mozak} / g	γ_{krv}^a / $\mu\text{g mL}^{-1}$	γ_{mozak}^b / $\mu\text{g g}^{-1}$	Omjer $\gamma_{\text{mozak}} / \gamma_{\text{krv}}$
1	30	34,6	0,42	15,83	1,01	0,06
2	33	34,1	0,37	19,69	1,28	0,07
3	35	34,1	0,33	31,83	2,35	0,07
4	35	35,5	0,33	25,96	6,66	0,26
5	42	30,0	0,33	22,78	1,73	0,08
6	49	37,7	0,33	21,88	2,06	0,09
7	60	30,2	0,42	15,92	1,80	0,11
8	60	38,5	0,34	1,80	n.o. ^c	0,00
9	63	33,5	0,39	6,84	n.o.	0,00
10	65	36,0	0,37	4,59	1,56	0,34
11	70	36,2	0,38	3,62	n.o.	0,00
12	73	33,7	0,37	4,95	n.o.	0,00
13	74	33,0	0,33	2,79	n.o.	0,00
14	180	33,7	0,35	2,21	n.o.	0,00
15	180	31,2	0,37	0,46	n.o.	0,00
16	180	31,1	0,36	0,50	n.o.	0,00
17	180	33,6	0,41	1,08	n.o.	0,00

^aKoncentracija u uzorku pomnožena s faktorom razrjeđenja; ^bKoncentracija u uzorku pomnožena s faktorom razrjeđenja i normalizirana prema masi mozga; ^cn.o. – koncentracije u pripremljenim uzorcima ispod granica detekcije ($0,13 \mu\text{g mL}^{-1}$).

4.2. Klorpiridinijevi oksimi

4.2.1. Procjena nukleofilnog potencijala prema pK_a oksimske skupine

Snimljeni apsorpcijski spektri 3-klorpiridinijevih (K865, K866, K867), 3,5-diklorpiridinijevih (K868, K869, K870) i piridinijevih oksima K027 i HI-6 u otopinama pH vrijednosti u rasponu 4,6 – 11,1 prikazani su na **slici 4.11**.



Slika 4.11. Apсорpcijski spektri klorpiridinijevih oksima u otopinama različitih pH vrijednosti.

Promjena intenziteta apsorbancije piridinijevih oksima na maksimumu 344 – 370 nm ovisi isključivo o promjeni koncentracije deprotoniranog oblika oksimske skupine i konstanta kiselo-bazne ravnoteže, K_a , izračunala se i prikazala kao pK_a vrijednost primjenom jednadžbe (1) i (3) (kolona 3 **tablice 4.14**).¹⁷² Vrijednost pK_a oksimske skupine određena je i iz sjecišta pH-ovisnosti apsorbancije pri maksimumu koji odgovara deprotoniranom obliku oksimske skupine (344 – 370 nm) i pH-ovisnosti apsorbancije pri maksimumu koji odgovara protoniranom obliku oksimske skupine (299 – 303 nm) (kolona 4 **tablice 4.14**) te je uočeno tek blago odstupanje od pK_a vrijednosti kolone 3 **tablice 4.14**.

Tablica 4.14. Eksperimentalno određene pK_a vrijednosti (\pm standardna pogreška) za oksimske skupine (=N-OH) klorpiridinijevih i piridinijevih oksima pri 25 °C te udio molekula s deprotoniranom oksimskom skupinom (oksimat) pri fiziološkom pH 7,4 izračunat prema jednadžbi (4).

Oksim	λ_{\max} pikova / nm	<i>In vitro</i> pK_a ($\lambda_{\max}=344-360$ nm) ^a	Iz sjecišta dviju specija ^b	Oksimat / %
K865	300/360	7,66 \pm 0,01	7,57	35/41
K866	300/356	7,82 \pm 0,01	7,68	28/34
K867	303/359	7,72 \pm 0,01	7,60	32/39
K868	299/370	7,68 \pm 0,01	7,53	35/43
K869	299/368	7,72 \pm 0,02	7,66	32/35
K870	300/370	7,66 \pm 0,02	7,55	35/42
K027	275/344	8,15 \pm 0,01	8,32 (8,42 ^c)	15/11
K048	-	-	8,44 ^d	-/9
K203	-	-	8,33 ^e	-/11
HI-6	300/355	7,38 \pm 0,03	7,46 ^c	51/47

^a pK_a vrijednost (\pm standardna pogreška) određena pomoću jednadžbe (1) i (3); ^bVrijednosti pK_a iz sjecišta pH-ovisnosti oksima s deprotoniranom odnosno protoniranom oksimskom skupinom; ^cPodaci iz ref. 186; ^dPodaci iz ref. 173; Podaci iz ref. 174.

Valna duljina apsorpcijskog maksimuma oksima pokazala je porast s brojem atoma klora na piridinijevom prstenu (10 – 12 nm po atomu klora), npr. piridinijev oksim bez atoma klora K027 je imao maksimum na 344 nm, a 3-klorpiridinijev oksim K865 i 3,5-diklorpiridinijev oksim K868 na 360 nm, odnosno 370 nm. Općenito, pK_a vrijednost oksimske skupine klorpiridinijevih oksima bila je oko 0,7 jedinice niža od one određene za analogne piridinijeve oksime bez klora. Očekuje se da klorpiridinijevi oksimi pri fiziološkom pH imaju 30 – 40 % molekuskog oblika s deprotoniranom oksimskom skupinom, dok se za njihove analoge bez atoma klora (K027, K048 i K203) očekuje oko 10 – 15% oksimata. Rezultati određivanja pK_a vrijednosti oksimske skupine za oksime K027 i HI-6 dobro se slažu s prije objavljenim rezultatima (8,42 za K027; 7,47 za HI-6).¹⁸⁶

4.2.2. Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima

Konstante disocijacije enzim-oksimum kompleksa, K_i , za komplekse AChE ili BChE s klorpiridinijevim oksimima i njihovim analogima bez atoma klora prikazane su u **tablici 4.15**. Svi kompleksi su imali K_i vrijednosti u mikromolarnom području, ali je afinitet AChE prema svim navedenim oksimima ($1/K_i$) bio oko 4 – 12 puta veći od afiniteta BChE. Također, afinitet AChE za klorpiridinijeve oksime je veći nego za analogne piridinijeve oksime bez klora. Dodatno, AChE i BChE pokazuju nešto veći afinitet prema 3,5-diklorpiridinijevim oksimima nego prema 3-klorpiridinijevim oksimima što sugerira da drugi atom klora dodatno stvara interakcije s aminokiselinama aktivnog ždrijela na način koji stabilizira enzim-oksimum kompleks.

Tablica 4.15. Konstante disocijacije ($K_i \pm$ standardna pogreška) za komplekse AChE ili BChE s klorpiridinijevim i piridinijevim oksimima određene koristeći navedene koncentracije oksima pri 25 °C.

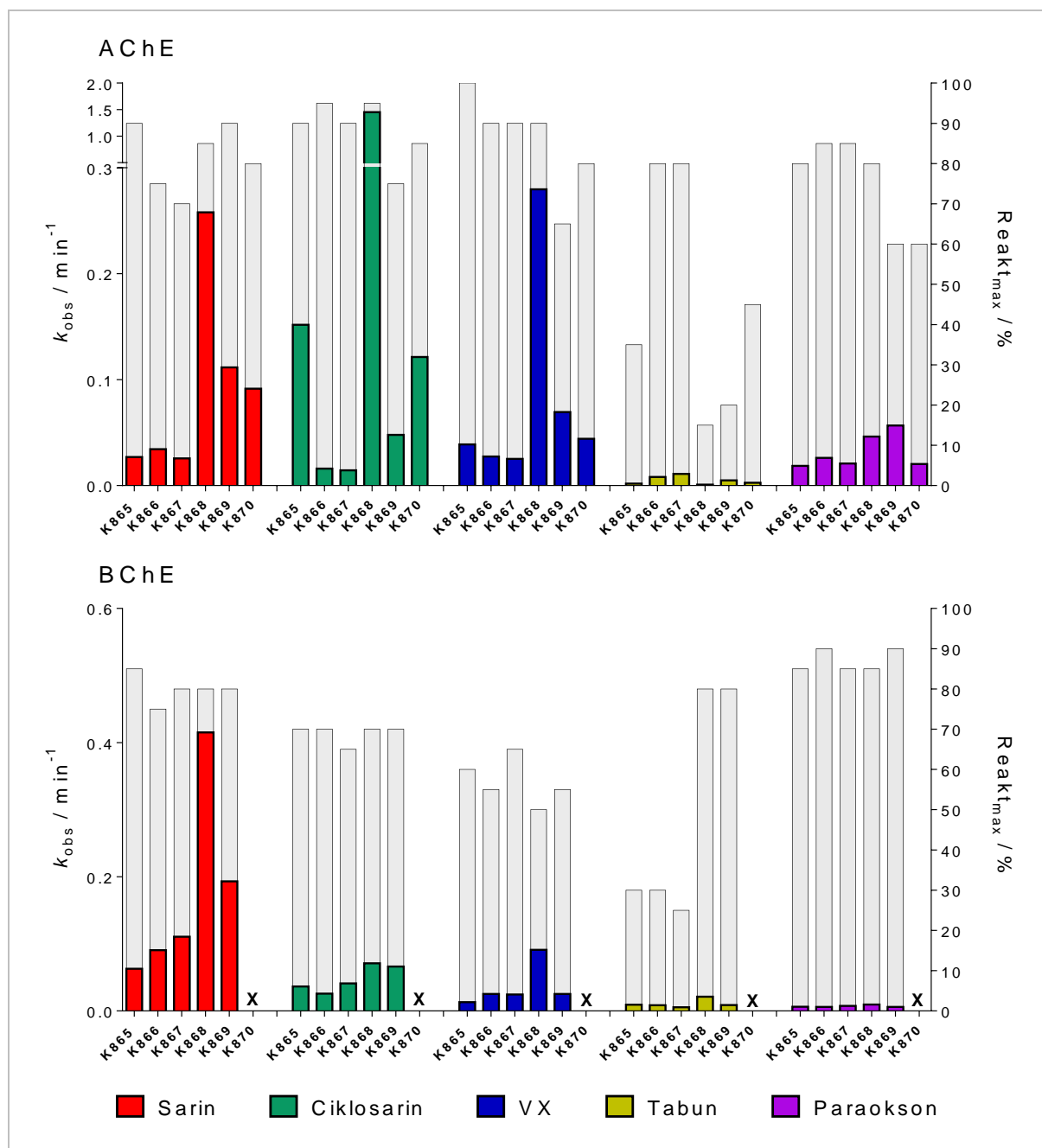
Oksim	AChE		BChE	
	Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	K_i / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	K_i / $\mu\text{mol dm}^{-3}$
K865	25 – 200	42 ± 4	200 – 1000	273 ± 42
K866	25 – 200	36 ± 5	200 – 1000	265 ± 52
K867	25 – 200	24 ± 3	200 – 1000	294 ± 41
K868	25 – 100	21 ± 2	100 – 300	195 ± 18
K869	25 – 100	12 ± 2	100 – 300	140 ± 12
K870	25 – 100	22 ± 2	100 – 300	187 ± 9
K027	64 – 450 ^a	73 ± 10	500 – 4500 ^c	660 ± 110
K048	100 – 500 ^a	110 ± 10	500 – 3000 ^c	420 ± 60
K203	50 – 500 ^c	90 ± 12	500 – 2000 ^b	910 ± 16

^aLjudska eritrocitna AChE, podaci iz ref. 56; ^bPodaci iz ref. 58; ^cPodaci iz ref. 177.

4.2.3. Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima

Povratak aktivnosti fosfiliranih kolinesteraza uslijed reaktivacije s klorpiridinijevim oksimima prvo je testirana pri jednoj koncentraciji oksima: 0,1 mmol dm⁻³ u slučaju AChE fosfiliranih sarinom, ciklosarinom, VX-om, tabunom i paraoksonom, odnosno 1 mmol dm⁻³ u slučaju reaktivacije BChE fosfilirane istim OP spojevima (**slika 4.12**). Prilikom reaktivacije inhibirane AChE ustanovljen je izniman reaktivacijski potencijal 3,5-diklorpiridinijevog oksima K868 za ciklosarin, kao i dobar potencijal za sarin i VX. S druge strane, reaktivacijski potencijal svih klorpiridinijevih oksima bio je najslabiji u slučaju tabuna i paraoksiona, i u tim slučajevima najučinkovitiji reaktivator je bio K867, odnosno K869. Radi utvrđivanja afiniteta inhibiranog enzima prema pojedinom klorpiridinijevom oksimu te ukupnog reaktivacijskog potencijala, napravljeni su detaljni kinetički eksperimenti reaktivacije inhibirane AChE s nizom

koncentracija oksima te su određeni reaktivacijski parametri uspoređeni s onima određenim za analogne piridinijeve oksime bez klora.



Slika 4.12. Reaktivacija AChE (gornji panel) i BChE (donji panel) inhibirane sarinom, ciklosarinom, VX-om, tabunom i paraoksonom s 0,1 mmol dm^{-3} (u slučaju AChE) ili s 1 mmol dm^{-3} (u slučaju BChE) klorpiridinijevim oksimima; na lijevoj ordinati je konstanta brzine reaktivacije prvog reda k_{obs} (min^{-1}) prikazana stupićima u boji, a na desnoj ordinati je vrijednost ostvarenog postotka reaktivacije (sivi stupići). Vrijednosti za K870 u slučaju BChE nisu mogle biti određene zbog inhibicije enzima s oksimom.

Općenito, u slučaju reaktivacije inhibirane BChE, brzina reaktivacije s klorpiridinijevim oksimima ovisno o OP spoju kretala se redom: sarin > VX ~ ciklosarin > tabun ~ paraokson. Oksim K868 je opet bio najmanje 2 – 4 puta brži reaktivator u slučaju sarina i VX-a od ostalih klorpiridinijevih oksima, a u slučaju ciklosarina bio je usporediv s oksimom K869. U slučaju reaktivacije tabuna i paraoksona k_{obs} su bile manje od $0,02 \text{ min}^{-1}$ unatoč visokoj koncentraciji oksima (1 mmol dm^{-3}). Zanimljivo je da je K868 pokazao određenu učinkovitost u reaktivaciji BChE inhibirane tabunom (80 % reaktivacije enzima u manje od 200 min), dok je u slučaju AChE inhibirane tabunom bio potpuno neučinkovit. K870 je reaktivirao BChE inhibiranu sarinom, ciklosarinom i VX-om do 100 %, 50 % i 30 % aktivnosti unutar 20 – 30 minuta, nakon čega je pokazao snažnu reinhibiciju enzima (reaktiviranog i kontrolnog enzima). U slučaju BChE inhibirane tabunom i paraoksonom, K870 je reaktivirao manje od 10 % inhibiranog enzima. Zbog manjeg afiniteta BChE prema klorpiridinijevim oksimima u odnosu na afinitet AChE, te njihovog relativno slabog reaktivacijskog potencijala s 1 mmol dm^{-3} koncentracijom oksima, detaljna kinetika reaktivacije fosfilirane BChE nije određivana.

U reaktivaciji BChE inhibirane sarinom i VX-om su svi oksimi, osim oksima K870, pokazali neobičnu dvofaznu ovisnost postotka reaktivacije o vremenu, tj. kratkotrajna brza reaktivacija iza koje slijedi usporenje brzine reaktivacije. Takav fenomen je primijećen i u reaktivaciji AChE inhibirane sarinom, ciklosarinom i VX-om s nekoliko oksima (naznačeno kasnije u poglavlju), a primjer je pokazan na **slici 4.13.A**. Pojava dvofaznosti u reaktivaciji s piridinijevim oksimima spominje se i u literaturi.^{187,188} Jedno od mogućih objašnjenja takvog profila reaktivacijske krivulje je reinhibicija enzima nastalim fosfiliranim oksimima koji mogu imati visok inhibicijski potencijal i tako usporiti reaktivaciju. Unatoč dvofaznoj reaktivacijskoj krivulji, k_{obs} vrijednosti su određene prema jednofaznoj eksponencijalnoj jednadžbi (12).

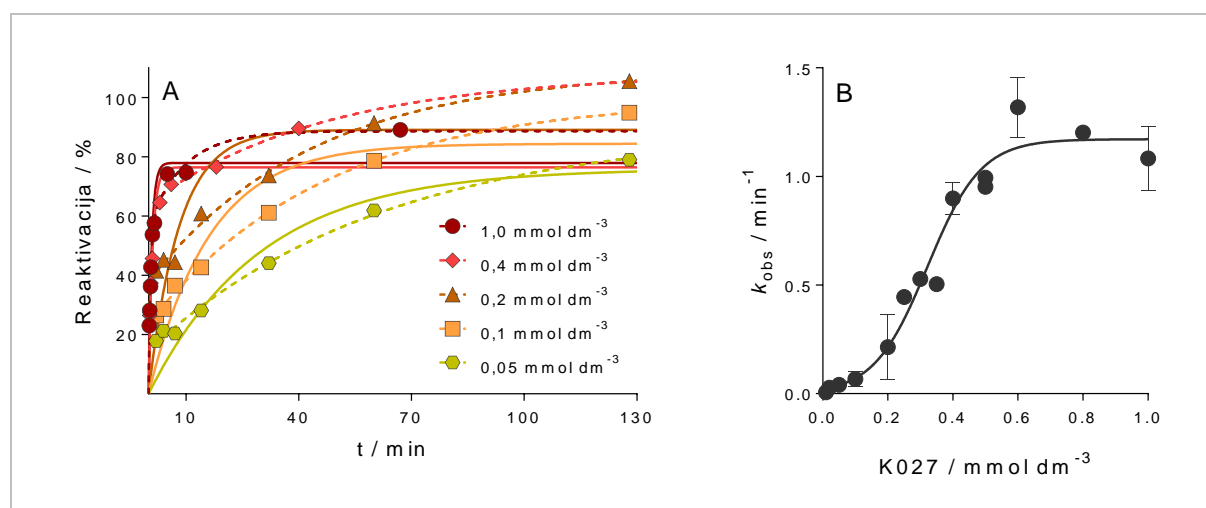
Klorpiridinijevi oksimi su se pokazali potentnim reaktivatorima u slučaju AChE inhibirane sarinom, tj. svi su reaktivirali 80 % inhibiranog enzima i postigli slične brzine nukleofilne supstitucije ($0,2 - 0,4 \text{ min}^{-1}$) kako je prikazano u **tablici 4.16**. AChE inhibirana sarinom je pokazala poprilično niži afinitet (14 – 23 puta) prema 3-klorpiridinijevim oksimima nego prema 3,5-diklorpiridinijevim oksimima. Također, bitno je spomenuti da je u reaktivaciji ovog konjugata s 3-klorpiridinijevim oksimima (K865, K866 i K867) i analognim piridinijevim oksimima bez klora (K027, K048, K203) uočena dvofazna ovisnost reaktivacije o vremenu.

Tablica 4.16. Reaktivacija sarinom inhibirane AChE klorpiridinijevim oksimima i analognim oksimima bez klora te oksimom HI-6: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (9) – (12) iz eksperimentalno dobivenih prividnih konstanti k_{obs} , te maksimalan postotak reaktivacije ($\text{Reakt}_{\text{max}}$) i vrijeme (t) u kojem je postignut. Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa izvedena pri 25 °C.

Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{+2} / min^{-1}	K_{OX} / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_r / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{min}^{-1}$	$\text{Reakt}_{\text{max}}$ / %	t / min
K865 (10-500) ^a	$0,37 \pm 0,14$	745 ± 425	490 ± 100	80	90
K866 (10-500) ^a	$0,38 \pm 0,16$	1150 ± 640	330 ± 50	80	90
K867 (10-500) ^a	$0,35 \pm 0,06$	840 ± 195	420 ± 30	80	60
K868 (10-200)	$0,43 \pm 0,04$	35 ± 10	12000 ± 2500	80	10
K869 (10-200)	$0,20 \pm 0,01$	50 ± 10	3880 ± 430	80	30
K870 (10-200)	$0,17 \pm 0,02$	60 ± 10	2830 ± 390	80	30
K027 (10-1000) ^b	$1,2 \pm 0,06$	320 ± 20	3640 ± 270	80	20
K048 (10-1000) ^a	$1,2 \pm 0,3$	510 ± 250	2340 ± 640	100	300
K203 (10-1000) ^a	$1,5 \pm 0,3$	650 ± 290	2250 ± 520	100	300
HI-6 (5-300)	$0,9 \pm 0,1$	170 ± 40	5420 ± 780	60-90	4

^aReaktivacija pokazuje dvofaznu ovisnost % reaktivacije o vremenu; ^bOvisnost k_{obs} o koncentraciji K027 pokazuje devijaciju od uobičajenog profila hiperbole; K_{OX} određena kao vrijednost IC_{50} sigmoidalne ovisnosti.

Također, u reaktivaciji AChE inhibirane sarinom je oksim K027 pokazao devijaciju od hiperbolne ovisnosti (slične Michaelis-Mentenčinom modelu) konstante brzine reaktivacije o koncentraciji oksima (**slika 4.13.B**), tj. pri koncentracijama iznad $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ je uočeno značajno ubrzanje reaktivacije u relativno uskom koncentracijskom području K027 (sigmoidalna ovisnost). Kada se uspoređuje s analognim 3,5-diklorpiridinijevim oksimom K868, K027 je postigao veće brzine nukleofilne supstitucije (k_{+2}) od K868, ali je inhibirani AChE inhibirana sarinom pokazala oko 10 puta manji afinitet prema K027 nego prema K868. Stoga je K868 najpotentniji reaktivator AChE inhibirane sarinom.



Slika 4.13. Anomalije od uobičajenih profila u reaktivaciji AChE inhibirane sarinom s oksimom K027: (A) vremenska ovisnost postotka reaktivacije te prilagodba funkcije za jednofaznu (puna linija) i dvofaznu (isprekidana linija) ovisnost, (B) ovisnost prividnih konstanti brzine reaktivacije, k_{obs} , o koncentraciji oksima.

Klorpiridinijevi oksimi su se pokazali dobrim reaktivatorima AChE inhibirane ciklosarinom (**tablica 4.17.**), a oksim K868 je potpuno reaktivirao enzim unutar minute čak i pri nižim koncentracijama. Zanimljivo je primijetiti da su svi 3,5-diklorpiridinijevi oksimi postigli 4 – 10 puta veće maksimalne konstante brzine reaktivacije u odnosu na 3-klorpiridinijeve oksime, dok je afinitet inhibiranog enzima prema analognim oksimima bio sličan. Analogni piridinijevi oksimi bez klora su ostvarili veće brzine nukleofilne supstitucije (k_{+2}) od 3-klorpiridinijevih oksima, ali je afinitet AChE inhibirane ciklosarinom bio 2 – 20 puta niži prema piridinijevim oksimima bez klora nego prema piridinijevim oksimima s jednim atomom klora. Pri reaktivaciji AChE inhibirane ciklosarinom, dvofazna ovisnost reaktivacijske krivulje uočena je samo kod piridinijevih oksima bez klora, K048 i K203.

Tablica 4.17. Reaktivacija ciklosarinom inhibirane AChE klorpiridinijevim oksimima i analognim oksimima bez klora i oksimom HI-6: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (9) – (12) iz eksperimentalno dobivenih prividnih konstanti k_{obs} , te maksimalan postotak reaktivacije (Reakt_{max}) i vrijeme (t) u kojem je postignut. Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa izvedena pri 25 °C.

Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{+2} / min^{-1}	K_{OX} / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_r / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{min}^{-1}$	Reakt _{max} / %	t / min
K865 (10-500)	$0,49 \pm 0,08$	200 ± 70	2500 ± 500	100	10
K866 (10-500)	$0,027 \pm 0,001$	80 ± 10	340 ± 40	100	150
K867 (10-500)	$0,040 \pm 0,002$	160 ± 20	240 ± 20	100	120
K868 (10-500)	$4,2 \pm 0,7$	160 ± 70	$25\,900 \pm 6400$	100	1
K869 (10-500)	$0,101 \pm 0,004$	50 ± 10	2120 ± 230	80	40
K870 (20-500)	$0,49 \pm 0,04$	220 ± 30	2200 ± 190	100	10
K027 (10-1000)	$1,2 \pm 0,06$	400 ± 40	2900 ± 180	100	5
K048 (10-1000) ^a	$0,07 \pm 0,02$	1740 ± 550	43 ± 4	100	240
K203 (10-1000) ^a	$0,08 \pm 0,02$	740 ± 270	110 ± 20	100	240
HI-6 (1-50) ^b	-	-	$22\,100 \pm 1300$	00	<1

^aReaktivacija pokazuje dvofaznu ovisnost % reaktivacije o vremenu; ^bLinearna ovisnost k_{obs} o koncentraciji oksima.

Reaktivacija AChE inhibirane VX-om (**tablica 4.18**) je bila učinkovita sa svim klorpiridinijevim oksimima. Unatoč tome što su najviše brzine reaktivacije ostvarene s piridinijevim oksimima bez klora K027 i K048, 3,5-diklorpiridinijev oksim K868 je opet bio najpotentniji testirani oksim zbog visoke k_{+2} u kombinaciji s visokim afinitetom inhibiranog enzima. Najveći afinitet inhibiranog enzima je uočen za 3,5-diklorpiridinijev oksim K869 ($K_{OX} = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$), koji je oko 10 puta veći nego za njegov 3-klorpiridinijev analog K866 te oko 30 puta veći nego za analogni piridinijev oksim bez klora K048. U reaktivaciji s analogima K867 i K870, nisu uočene značajne razlike afiniteta enzima ili brzine reaktivacije. Dvofazna ovisnost reaktivacijske krivulje i ovdje je uočena s oksimima K866, K048 i K203.

Tablica 4.18. Reaktivacija VX-om inhibirane AChE klorpiridinijevih oksimima i analognim oksimima bez klora i oksimom HI-6: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (9) – (12) iz eksperimentalno dobivenih prividnih konstanti k_{obs} , te maksimalan postotak reaktivacije ($\text{Reakt}_{\text{max}}$) i vrijeme (t) u kojem je postignut. Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa izvedena pri 25 °C.

Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{+2} / min^{-1}	K_{OX} / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_r / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{min}^{-1}$	$\text{Reakt}_{\text{max}}$ / %	t / min
K865 (10-500)	0,17 \pm 0,02	200 \pm 50	820 \pm 130	100	40
K866 (20-500) ^a	0,18 \pm 0,02	430 \pm 80	410 \pm 40	100	100
K867 (20-500)	0,14 \pm 0,01	320 \pm 60	440 \pm 40	100	60
K868 (10-500)	0,53 \pm 0,05	70 \pm 20	7660 \pm 1280	100	10
K869 (10-500)	0,18 \pm 0,01	40 \pm 10	4310 \pm 840	60	20
K870 (10-500)	0,059 \pm 0,003	10 \pm 4	6500 \pm 2370	80	60
K027 (10-500)	1,1 \pm 0,4	920 \pm 500	1180 \pm 280	100	20
K048 (10-1000) ^a	0,9 \pm 0,2	1130 \pm 310	775 \pm 90	100	120
K203 (10-1000) ^a	0,5 \pm 0,1	290 \pm 210	1530 \pm 720	100	120
HI-6 (10-1000) ^b	0,33 \pm 0,02	60 \pm 10	5740 \pm 1120	90	15

^aReaktivacija pokazuje dvofaznu ovisnost % reaktivacije o vremenu; ^bPodaci iz ref. 175.

U slučaju reaktivacije AChE inhibirane tabunom, svi 3-klorpiridinijevi oksimi su reaktivirali enzim do 80 % aktivnosti u vremenu od 30 – 300 minuta, dok su 3,5-diklorpiridinijevi oksimi bili potpuno neučinkoviti (**tablica 4.19**). Iako je ukupni reaktivacijski potencijal (k_r) 3-klorpiridinijevih oksima imao isti trend (K865 < K866 < K867) kao kod analognih piridinijevih oksima bez klora (K027 < K048 < K203),^{56,58} maksimalna konstanta brzine reaktivacije 3-klorpiridinijevog oksima K867 je bila oko šest puta niža od one objavljene za najpotentniji piridinijev oksim bez klora u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom, K203, koji se pokazao potentnijim reaktivatorom i od standardnog oksima TMB-4.⁵⁸

Tablica 4.19. Reaktivacija tabunom inhibirane AChE klorpiridinijevih oksimima i analognim oksimima bez klora te standardnim oksimima TMB-4 i HI-6: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (9) – (12) iz eksperimentalno dobivenih prividnih konstanti k_{obs} , te maksimalan postotak reaktivacije ($\text{Reakt}_{\text{max}}$) i vrijeme (t) u kojem je postignut. Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa izvedena pri 25 °C.

Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{+2} / min^{-1}	K_{OX} / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_r / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{min}^{-1}$	$\text{Reakt}_{\text{max}}$ / %	t / min
K865 (10-500)	0,0020 \pm 0,0001	7 \pm 3	280 \pm 120	80	24h
K866 (10-500)	0,017 \pm 0,001	40 \pm 10	470 \pm 80	80	400
K867 (10-500)	0,021 \pm 0,001	40 \pm 10	560 \pm 110	80	200
K868 (10-500) ^a	-	-	-	<20	24h
K869 (10-500) ^a	-	-	-	<20	24h
K870 (50) ^a	-	-	-	<40	10h
K027 (30-5000) ^b	0,032 \pm 0,002	85 \pm 20	380 \pm 90	100	120
K048 (50-5000) ^b	0,074 \pm 0,003	110 \pm 10	670 \pm 70	100	30
K203 (10-1000) ^c	0,13 \pm 0,01	70 \pm 20	1800 \pm 490	90	20
TMB-4 (50-5000) ^b	0,15 \pm 0,02	490 \pm 200	310 \pm 130	100	20
HI-6 (100-1000) ^a	-	-	-	10	24 h

^aParametri nisu određeni zbog slabog reakt. potencijala; ^bLjudska eritrocitna AChE, podaci iz ref. 56; ^cPodaci iz ref. 58.

Reaktivacija AChE inhibirane paraoksonom klorpiridinijevim oksimima i analogima je prikazana u **tablici 4.20**. Afinitet AChE inhibirane paraoksonom prema svim klorpiridinijevim oksimima je bio usporediv ($K_{OX} = 60 - 130 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i postignuti $Reakt_{max}$ je bio zadovoljavajući (80 %). Međutim, oksim K869 je bio najpotentniji reaktivator zbog najveće konstante brzine reaktivacije k_{+2} . Oksim K870 je pokazao pad konstanti brzine reaktivacije i inhibiciju enzima oksimom pri koncentracijama $> 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$. Najveća brzina nukleofilne supstitucija dobivena je pri reaktivaciji s piridinijevim oksimom bez klora K027, iako je prema njemu AChE inhibirana paraoksonom pokazala najniži afinitet među testiranim oksimima.

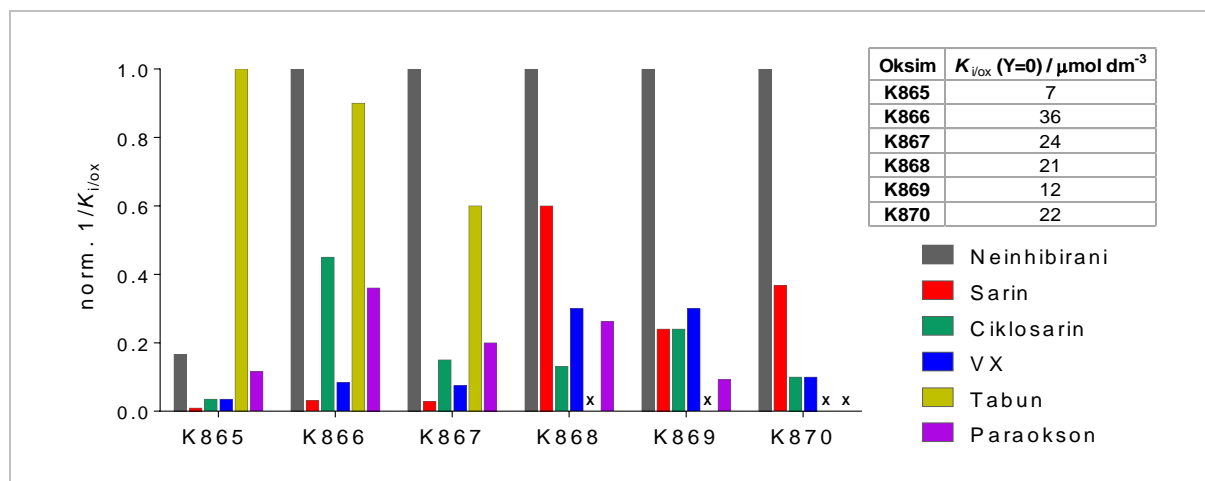
Tablica 4.20. Reaktivacija paraoksonom inhibirane AChE klorpiridinijevim oksimima i analognim oksimima bez klora: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (9) – (12) iz prividnih konstanti k_{obs} , eksperimentalno dobivenih iz provedenih pokusa, te maksimalan postotak reaktivacije ($Reakt_{max}$) i vrijeme (t) u kojem je postignut. Parametri su evaluirani iz najmanje tri pokusa izvedena pri 25 °C.

Oksim / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{+2} / min^{-1}	$K_{OX} / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_r / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$	$Reakt_{max} / \%$	t / min
K865 (10-500)	$0,040 \pm 0,002$	60 ± 10	630 ± 80	80	100
K866 (10-500)	$0,064 \pm 0,005$	100 ± 20	670 ± 110	80	60
K867 (10-500)	$0,05 \pm 0,01$	120 ± 50	470 ± 140	80	100
K868 (10-200)	$0,11 \pm 0,01$	80 ± 20	1300 ± 260	80	60
K869 (10-500)	$0,21 \pm 0,02$	130 ± 40	1600 ± 280	60	30
K870 (10-100) ^a	$0,04 \pm 0,01$	35 ± 25	1340 ± 660	90	150
K027 (10-500)	$0,41 \pm 0,07$	460 ± 160	890 ± 180	80	30
HI-6 (100–1500)	$0,026 \pm 0,001$	590 ± 50	$50 \pm 2,2$	90	170

^aSniženje prividnih konstanti k_{obs} i inhibicija enzima pri K870 $> 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$.

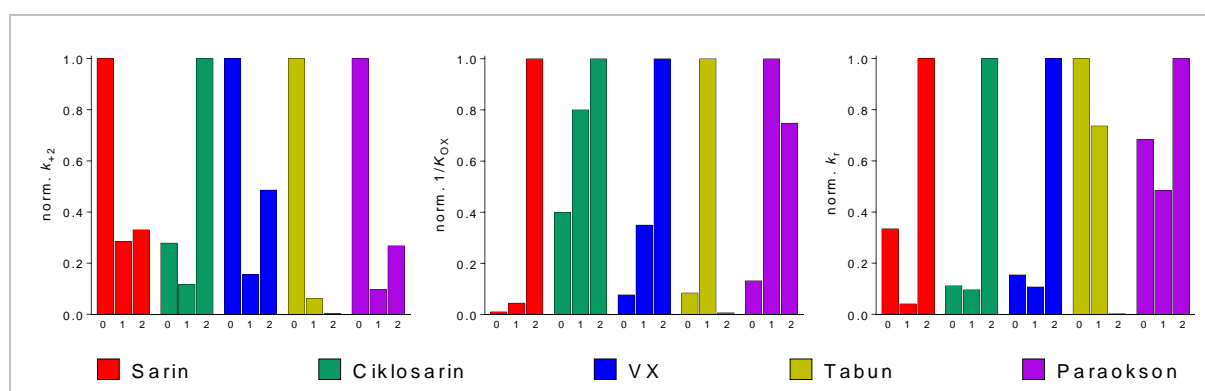
4.2.4. Afinitet različitih konjugata enzima prema oksimima te molekulsko modeliranje

Afiniteti AChE prema klorpiridinijevim oksimima bio je veći kada je enzim neinhibiran nego kada je bio inhibiran s bilo kojim OP spojem, osim za slučaj oksima K865 za kojeg je AChE inhibiran tabunom imao najveći afinitet, a tek onda neinhibirani enzim (razlika afiniteta približno 6 puta) (**slika 4.14**). Budući da se 3,5-diklorpiridinijev oksim K868 pokazao najpotentnijim reaktivatorom za AChE inhibiranu sarinom, ciklosarinom i VX-om, on i njegovi analozi, 3-klorpiridinijev oksim K865 i piridinijev oksim bez klora K027, su uzeti za procjenu utjecaja atoma klora vezanih na piridinijev prsten na reaktivacijski potencijal tj. na reaktivacijske parametre ostvarene pri reaktivaciji pojedinih konjugata inhibirane AChE. Uspoređujući reaktivacijske parametre (**slika 4.15**) vidi se da afinitet inhibiranih enzima raste s porastom broja atoma klora vezanih na piridinijev prsten kod reaktivacije AChE inhibirane sarinom, ciklosarinom i VX-om, dok je u slučaju paraoksiona i tabuna afinitet najveći prema 3-klorpiridinijevom oksimu K865.



Slika 4.14. Usporedba afiniteta AChE za pojedini klorpiridinijev oksim kada je enzim neinhirani, odnosno inhibiran sarinom, ciklosarinom, VX-om, tabunom ili paraoksonom. Vrijednosti su normalizirane prema najvećem ostvarenom afinitetu ($1/K_{iOx}$) za pojedini oksim (odgovarajuće konstante disocijacije prikazane u tablici).

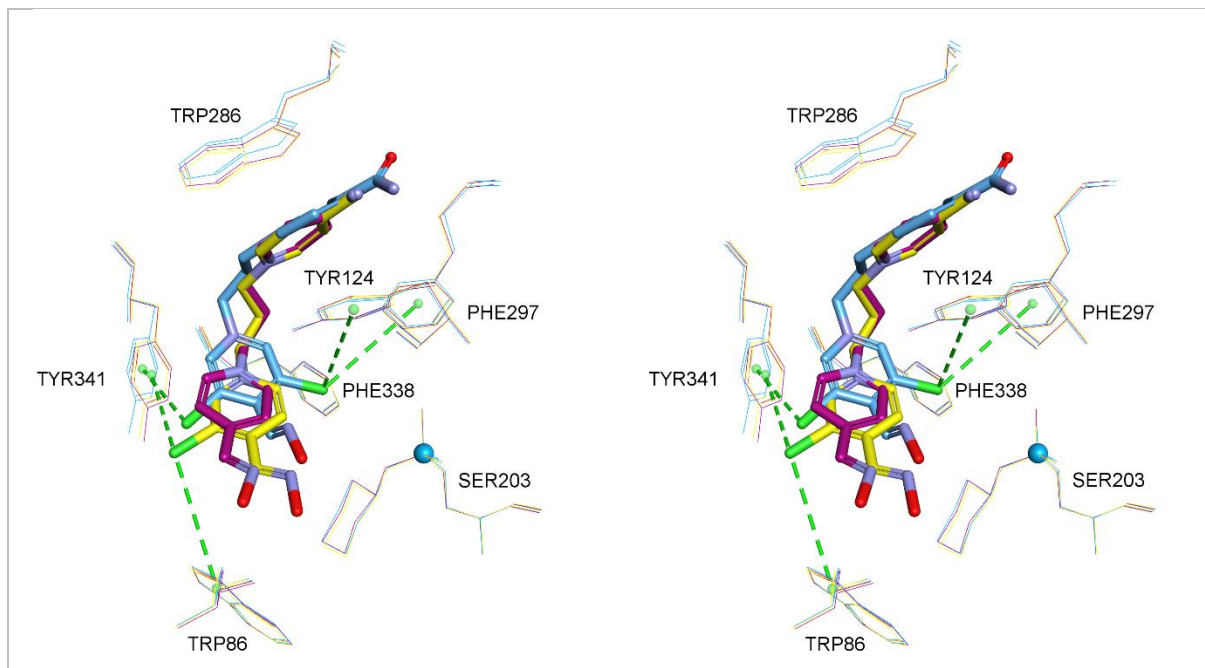
Iako je piridinijev oksim bez klora K027 ostvario najveće konstante brzine reaktivacije kod reaktivacije AChE inhibirane svim OP spojevima osim ciklosarina, ukupne konstante brzine reaktivacije su bile najveće za 3,5-diklorpiridinijev oksim u svim slučajevima osim u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom. Oksim K868 je bio potpuno neučinkovit u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom što može značiti da drugi atom klora uzrokuje značajne promjene u interakcijama između oksima i inhibiranog enzima. Iako je AChE inhibirana tabunom imala najveći afinitet za K865, bolja ukupna reaktivacija je dobivena za piridinijev oksim K027. Stoga kod tabuna dolazi do izražaja koliko je važna brzina nukleofilne supstitucije između oksima i OP ostatka vezanog na serin enzima i koliko reaktivacija pojedinim oksimom ovisi o strukturi OP spoja. K868 je jedino u slučaju reaktivacije AChE inhibirane ciklosarinom imao najveću k_{+2} te najveći afinitet inhibiranog enzima (najmanji K_{OX}) u odnosu na analogne oksime.



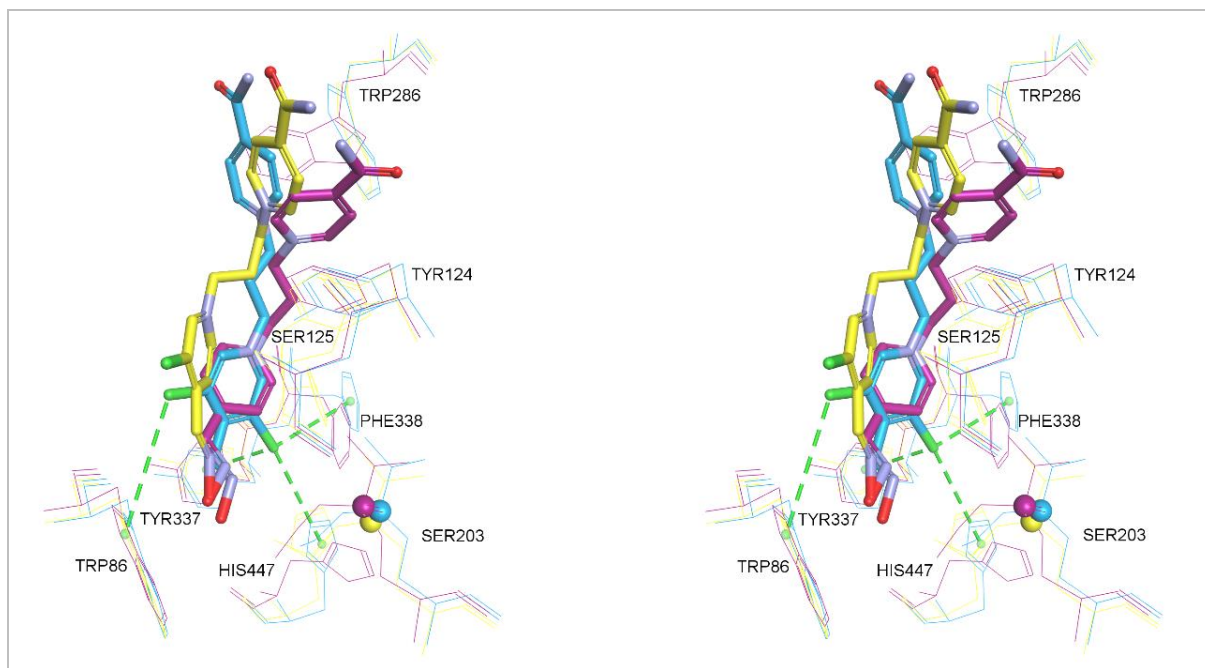
Slika 4.15. Ovisnost maksimalne konstante brzine reaktivacije (k_{+2}), afiniteta inhibiranog enzima prema oksimu ($1/K_{OX}$) i ukupne konstante brzine reaktivacije (k_r) za reaktivaciju AChE inhibirane sarinom, ciklosarinom, VX-om, tabunom ili paraoksonom o broju atoma klora vezanih na piridinijev prsten s oksimskom skupinom (naznačeno na apscisi: 0 za oksim K027, 1 za oksim K865 i 2 za oksim K868).

Dodatno se utjecaj broja atoma klora vezanih na piridinijev prsten ispitao molekulskim modeliranjem smještanja ovih analognih oksima unutar ždrijela aktivnog mjesta AChE inhibirane ciklosarinom i tabunom, dva slučaja inhibicije AChE koji pokazuju drugačije trendove ovisnosti reaktivacijskih parametara o atomima klora. Iznenadujuće, modeliranje u AChE inhibiranoj ciklosarinom nije pokazalo značajne razlike u smještanju analognih oksima K027, K865 i K868 (**slika 4.16**) koje bi objasnile izuzetno bolju reaktivacijsku učinkovitost oksima K868 u reaktivaciji AChE inhibirane ciklosarinom u odnosu na analoge. Svi oksimi su zauzeli orijentaciju u kojoj se karbamoilirani piridinijev prsten nalazi u perifernom anionskom mjestu smješten u tzv. π - π sendviču između aminokiselina Tyr124 i Trp286, dok je piridinijev prsten s oksimskom skupinom orijentiran prema dnu aktivnog mjesta blizu Trp86. Jedino je uočena razlika u udaljenosti kisika oksimske skupine i atoma fosfora koja je bila najmanja u slučaju oksima K868 (6,9 Å) u usporedbi s udaljenostima za K865 (8,1 Å) i K027 (9,4 Å) oksime. Broj predviđenih nekovalentnih interakcija između oksima i susjednih aminokiselina slijedio je trend porasta afiniteta AChE inhibirane ciklosarinom ($1/K_{ox}$) prema analognim oksimima: $K027 < K865 < K868$ (vidi **tablicu 4.17**) što podupire hipotezu da se afinitet AChE inhibirane ciklosarinom povećava s brojem klorovih atoma (vidi **tablicu 4.17**) budući da su 3-klorpiridinijev oksim K865 i 3,5-diklorpiridinijev oksim K868 ostvarili hidrofobne- π -alkilne interakcije između atoma klora i aminokiselina AChE te je ukupno oksim K865 ostvario dvije takve interakcije, a oksim K868 četiri.

Modeliranje smještanja analognih oksima K027, K865 i K868 u konjugatu AChE inhibirane tabunom (**slika 4.17**) također nije pokazalo značajne razlike u smještanju oksima koje bi mogle objasniti njihov *in vitro* određen reaktivacijski potencijal. Pokazane su tek blage devijacije u smještanju piridinijevih prstena, ali su oksimske skupine sva tri oksima bile skoro preklapljene. Veći afinitet AChE inhibirane tabunom prema oksimu K865 nego prema oksimu K027 mogao bi se objasniti vodikovom vezom između njegovog atoma klora i Ser125. Oksim K868 također ostvaruje hidrofobne- π -alkil interakcije između atoma klora i susjednih aminokiselnih pobočnih lanaca, ali njegov afinitet nije mogao biti određen *in vitro* zbog neučinkovite nukleofilne supstitucije između oksima i fosfiliranog enzima. Moguće objašnjenje potpune neučinkovitosti K868 u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom jest da opisane interakcije stabiliziraju oksim K868 u konformaciji nepovoljnoj za nukleofilni napad i reaktivaciju AChE inhibirane tabunom, a moguće je da neproduktivnu konformaciju uzrokuju i steričke smetnje između N,N-dimetilne skupine tabuna i drugog atoma klora oksima K868.



Slika 4.16. Stereoskopski prikaz superpozicije modeliranih kompleksa između AChE inhibirane ciklosarinom (PDB ID: 5FPP) i oksima K027 (ljubičasto), K865 (žuto) i K868 (plavo). Ostatak ciklosarina vezanog za serin je istaknut kuglastim prikazom fosfora, a nekovalentne interakcije između atoma klora oksima i enzima su prikazane isprekidanim zelenim linijama.



Slika 4.17. Stereoskopski prikaz superpozicije modeliranih kompleksa između AChE inhibirane tabunom (PDB ID: 2JEZ, 3DL4 i 2JF0) i oksima K027 (ljubičasto), K865 (žuto) i K868 (plavo). Ostatak tabuna vezanog za serin je istaknut kuglastim prikazom fosfora, a nekovalentne interakcije između atoma klora oksima i enzima su prikazane isprekidanim zelenim linijama.

4.2.5. Fizikalno-kemijska svojstva oksima

Fizikalno-kemijska svojstva koje opisuju veličinu, polarnost i fleksibilnost klorpiridinijevih oksima prikazani su u **tablici 4.21**. Unatoč prisustvu atoma klora, klorpiridinijevi oksimi su molekule umjerene veličine (320 – 370 g mol⁻¹). Područje njihove polarne površine je iznad preporučenih vrijednosti (> 80 Å²), ali imaju povoljan nizak broj donora i akceptora vodikovih veza. Također, imaju umjeren broj veza koje rotiraju (6 – 7).¹⁵³

Tablica 4.21. *In silico* određena svojstva: molarna masa (M), područje ukupne polarne površine (TPSA), broj donora (HBD) i akceptora (HBA) vodikovih veza, te broj veza koje se rotiraju (RB).

Oksim	M / g mol ⁻¹	TPSA ^a / Å ²	HBD ^a	HBA ^a	RB
K865	320,79	83,44	2	3	6
K866	334,81	83,44	2	3	7
K867	332,80	83,44	2	3	6
K868	355,23	83,44	2	3	6
K869	369,25	83,44	2	3	7
K870	367,24	83,44 (86,27)	2 (1)	3 (2)	6
Preporuke^b	< 450	< 60 – 70	< 3	< 7	< 8

^aVrijednosti TPSA, HBD, HBA u zagradi predstavljaju vrijednosti za pH 7,4; ^bPreporuke iz ref. 153.

In silico su određene pK_a vrijednosti oksimske skupine klorpiridinijevih oksima i drugih piridinijevih oksima za usporedbu (**tablice 4.22**) kako bi se utvrdilo je li za piridinijeve oksime moguće pouzdano odrediti kiselo-bazne konstante disocijacije *in silico*.

Tablica 4.22. *In silico* određene pK_a vrijednosti oksimske skupine navedenih piridinijevih oksima te njihova razlika od eksperimentalno određenih pK_a vrijednosti.

Oksim	<i>In silico</i> pK _a	<i>In silico</i> pK _a (modifikacija) ^a	ΔpK _a (eksp. – <i>in silico</i>) ^b
K865	8,73	8,23	- 1,16 (- 0,66)
K866	8,78	8,30	- 1,1 (- 0,62)
K867	7,85	7,99	- 0,25 (- 0,39)
K868	7,64	7,78	- 0,11 (- 0,25)
K869	7,69	7,84	- 0,03 (- 0,18)
K870	6,78	7,53	0,77 (0,02)
K027	9,99	8,91	- 1,67 (- 0,59)
K048	10,06	9,00	- 1,62 (- 0,56)
K203	9,10	8,69	- 0,77 (- 0,36)
HI-6	4,03	7,40	3,43 (- 0,06)

^aStruktura oksima *in silico* modificirana zamjenom kvaternog dušika ugljikom; ^bRazlika pK_a vrijednosti oksimske skupine određene eksperimentalno (iz sjecišta; **tablica 4.14**) i *in silico* (u zagradi razlika od *in silico* određene pK_a vrijednosti za modificiranu strukturu oksima).

Naime, za oksim HI-6, koji ima oksimsku skupinu vezanu na piridinijev prsten u *orto*-položaju, uočena je znatna razlika između pK_a vrijednosti oksimske skupine određene *in silico* i eksperimentalno (oko 3 jedinice). Pod pretpostavkom da je loš *in silico* izračun pK_a posljedica pozitivno nabijenog kvaternog dušika unutar piridinijevog prstena s vezanom oksimskom

skupinom, napravljena je *in silico* modifikacija u strukturi oksima (zamjena tog kvaternog dušika ugljikom) i to je rezultiralo *in silico* pK_a vrijednošću koja je usporediva s eksperimentalno određenom vrijednosti. Za razliku od oksima HI-6, *in silico* određene pK_a vrijednosti oksimske skupine klorpiridinijevih oksima i ostalih piridinijevih oksima s oksimskom skupinom u *para*-položaju, bile su relativno usporedive s eksperimentalno određenim vrijednostima i kada *in silico* strukture nisu bile modificirane. Ipak, ista *in silico* modifikacija (kvaterni dušik u ugljik) većine *para*-piridinijevih oksima rezultirala je *in silico* pK_a vrijednostima oksimske skupine koje su bliže eksperimentalno određenim vrijednostima. Općenito, trend kretanja *in silico* pK_a vrijednosti klorpiridinijevih oksima ovisan o strukturnim karakteristikama oksima, isti je kao kod eksperimentalno određenih vrijednosti.

Tablica 4.23. Koeficijenti lipofilnosti ($\log P$ i $\log D_{7,4}$) određeni *in silico* te kromatografski određen Chrom $\log D_{7,4}$ za navedene piridinijeve oksime.

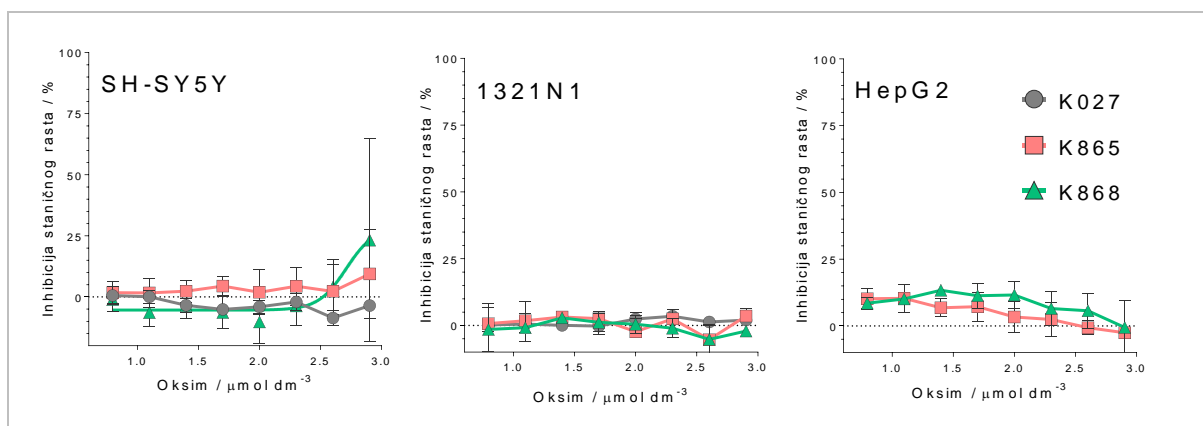
Oksim	$\log P^a$	$\log D_{7,4}^b$	Chrom $\log D_{7,4}^c$
K865	- 7,31	- 7,33	< - 0,32
K866	- 6,79	- 6,81	< - 0,32
K867	- 6,84	- 6,96	< - 0,32
K868	- 6,71	- 6,89	< - 0,32
K869	- 6,19	- 6,35	< - 0,32
K870	- 6,24	- 6,85	< - 0,32
K027	- 7,91	- 7,92	< - 0,32
K048	- 7,40	- 7,40	< - 0,32
K203	- 7,45	- 7,46	< - 0,32
2-PAM	- 3,26	- 4,31	< - 0,32
HI-6	- 7,59	- 8,77	< - 0,32
Obidoksim	-6,93	-6,96	< - 0,32

^a*In silico* $\log P$ vrijednost određena za nenabijenu molekulska vrstu pomoću ChemAxon's Marvin računalnog programa (Consensus metoda); ^bProcjena *in silico* $\log D_{7,4}$ vrijednosti ovisi o *in silico* određenim pK_a vrijednostima; ^cChrom $\log D_{7,4}$ izračunat je iz određenih CHI vrijednosti pomoću kromatografske metode.

In silico su određeni koeficijenti lipofilnosti $\log P$ i $\log D$ pri pH 7,4 za klorpiridinijeve oksimi i drugi piridinijeve oksime (tablica 4.23). Za analogne piridinijeve oksime, može se uočiti povećanje vrijednosti $\log P$ i $\log D$ s brojem vezanih atoma klora, ali klorpiridinijevi spojevi i dalje su izrazito hidrofilni. Hidrofilnost svih piridinijevih oksima potvrđena je i kromatografskim određivanje koeficijenta lipofilnosti Chrom $\log D$. Naime, Chrom $\log D$ vrijednosti piridinijevih oksima nije bilo moguće odrediti niti pri jednoj pH (pH 2,7, pH 7,4 ili pH 10,5) jer su u svim uvjetima bili hidrofilniji od najhidrofilnijeg standarda koji su imali Chrom $\log D$ pri navedenim pH jednaku 17,9, - 0,32, odnosno - 1,57.

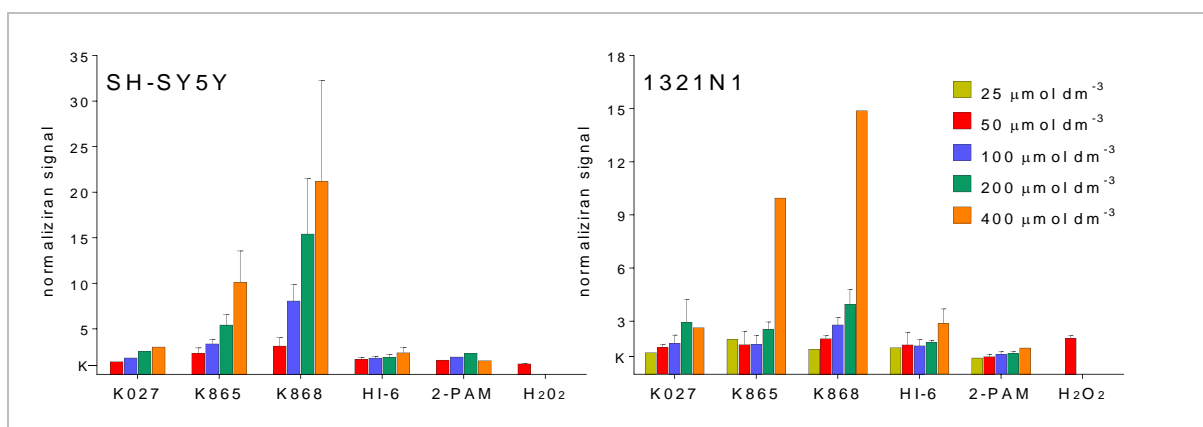
4.2.6. Citotoksičnost oksima i indukcija oksidacijskog stresa u staničnim linijama

U staničnim linijama neuroblastoma, astrocitoma, hepatocita i nefrocita testiran je citotoksični potencijal najperspektivnijeg reaktivatora u skupini klorpiridinijevih oksima – oksima K868 i njegovih analoga K027 i K865 (slika 4.18).



Slika 4.18. Inhibicija staničnog rasta (%) neuroblastoma (SH-SY5Y), astrocitoma (1321N1), hepatocita (HepG2) uslijed 24-satnog tretmana oksimima K027, K865 i K868.

Nijedan od testiranih oksima nije pokazao značajnu inhibiciju staničnog rasta pri testiranim koncentracijama, te se čini da dodatak atoma klora na piridinijeve oksime s propilenskom poveznicom između prstena nema utjecaja na citotoksičan potencijal ovih oksima. S druge strane, uočeno je povećanje indukcije oksidacijskog stresa u staničnim linijama neuroblastoma i astrocitoma proporcionalno broju atoma klora vezanih na piridinijev prsten (slika 4.19).



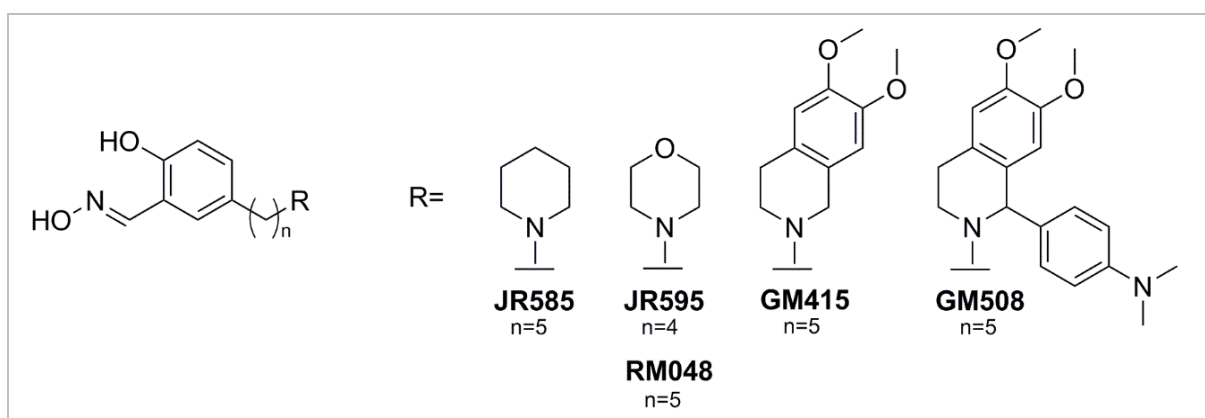
Slika 4.19. Indukcija oksidacijskog stresa u staničnoj liniji neuroblastoma (SH-SY5Y) ili astrocitoma (1321N1) nakon 4-satnog tretmana oksimima K027, K865 i K868 te standardnim oksimima HI-6 i 2-PAM, odnosno H₂O₂ spojem kao ROS vrstom (pozitivna kontrola). Vrijednosti na ordinati odgovaraju indukciji oksidacijskog stresa dobivenih pri različitim koncentracijama pojedinog oksima (normalizirane prema indukciji ROS vrsta u netretiranim stanicama, K=1).

§ 5. RASPRAVA

Cilj dizajna i sinteze novih reaktivatora kolinesteraza inhibiranih OP spojevima je dobiti reaktivator djelotvoran za raznovrsne OP spojeve te reaktivator koji bi ujedno u većoj mjeri prolazio kroz KMB-u. Stoga se sintetiziraju reaktivatori koji su lipofilniji od standardnih piridinijevih oksima kako bi se pospješio pasivni transport kroz KMB-u. Međutim, za očekivat je da će lipofilniji reaktivatori imati nešto drugačiji farmakokinetički profil i uzrokovati više nuspojava od standardnih oksima. Stoga bi kod takvih molekula trebalo voditi računa o terapijskom rasponu koncentracija spoja unutar kojeg se može ostvariti farmakološko djelovanje bez pojave neželjenih učinaka. U ovom radu je ispitan i procijenjen farmakološki potencijal dviju novih skupina reaktivatora, hidroksipiridinskih i klorpiridinijevih oksima, koristeći *in silico*, *in vitro* i *in vivo* metode. Osim određivanja afiniteta farmakološke mete za ove oksime i određivanja učinka u reaktivaciji kolinesteraza inhibiranih s četiri različita živčana bojna otrova i jednim pesticidom, djelomično su određeni i njihovi farmakokinetički i toksikološki profili kako bi se u ranoj fazi istraživanja moglo procijeniti imaju li novosintetizirani oksimi potencijal zamijeniti standardne oksime u medicinskoj praksi.

Oksimi iz skupine hidroksipiridinskih oksima, dizajnirani su i sintetizirani kao bifunkcionalni reverzibilni inhibitori AChE s dva strukturno različita dijela. Prvi dio je piridinski prsten na koji je vezana oksimska skupina koja djeluje kao nukleofil i ima ulogu u reaktivaciji AChE inhibirane OP spojem, dok drugi dio molekule služi za vezanje na periferno anionsko mjesto enzima te tako omogućava željenu orijentaciju oksima unutar aktivnog mjesta enzima, tj. orijentaciju u kojoj je oksimska skupina usmjerena prema fosfiliranom serinu na dnu aktivnog mjesta što dovodi do uspješne reaktivacije inhibiranog enzima. Poznato je da AChE ima veći afinitet za takve bifunkcionalne reaktivatore nego za one koji imaju samo jednu funkcionalnu skupinu za vezanje u aktivnom mjestu enzima.^{114,178,189} Iako se velik afinitet neinhibiranog enzima za oksim smatra nedostatkom, jer ima za posljedicu inhibiciju enzima samim oksimom, moguće je da koncentracije oksima koje se mogu postići *in vivo* ne inhibiraju značajno aktivnost AChE, pogotovo u uvjetima trovanja OP spojevima kada se akumulirani ACh može kompetitivno natjecati s oksimom za vezanje na katalitičko mjesto enzima. Također, reverzibilni inhibitori se koriste i kao zaštita AChE tako što kratkotrajno zauzimaju aktivno

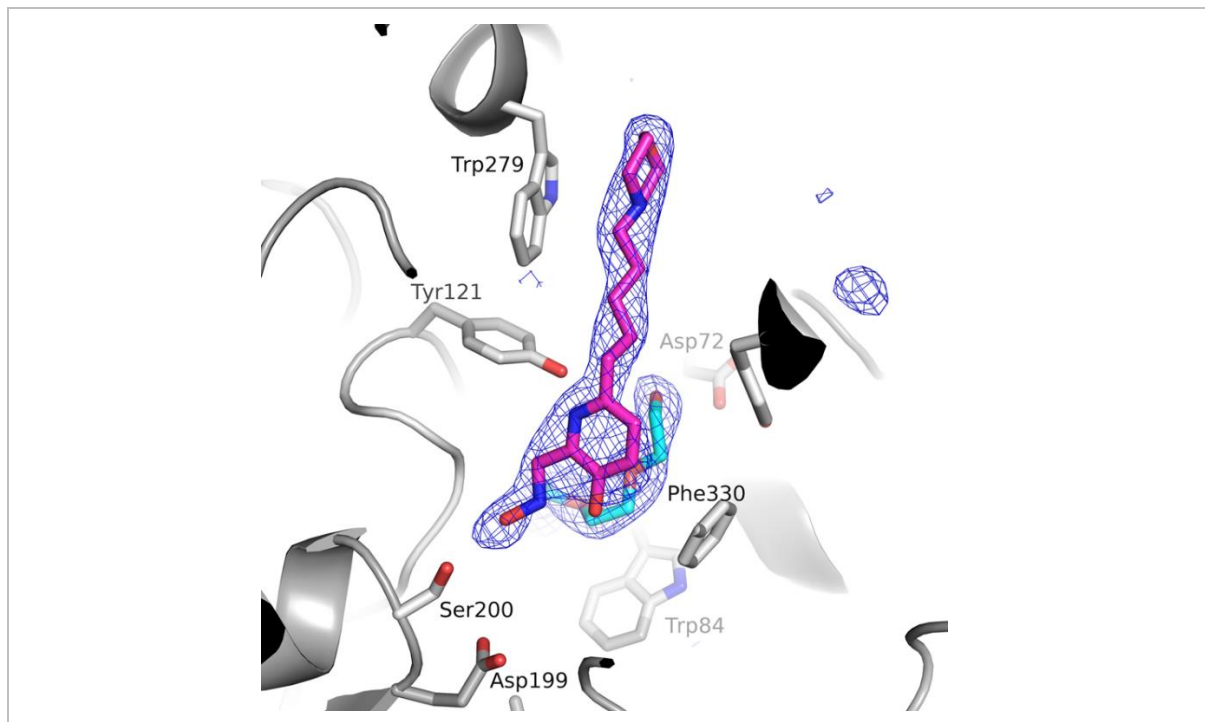
mjesto enzima i sprječavaju fosfilaciju katalitičkog serina OP spojem,¹⁹⁰ pod pretpostavkom da su primijenjeni prije izlaganja OP spoju ili neposredno nakon izlaganja. Također, ova skupina oksima nema kvaterni dušikov atom unutar piridinskog prstena (kao npr. standardni piridinijevi oksimi), već je ugljikov lanac vezan na položaj 6 piridinskog prstena i time je izbjegnuta stalni pozitivni naboj molekule. Međutim, zbog postojanja različitih funkcionalnih skupina koje su podložne ionizaciji, pri fiziološkom pH se očekuje istovremeno postojanje nabijenih i nenabijenih molekularnih vrsta (različite mikrospecije) hidrokspiridinskih oksima. U svakom slučaju, očekuje se da bi nenabijene molekularne vrste hidrokspiridinskih oksima prolazile kroz KMB-u većom brzinom i u većoj mjeri nego stalno nabijeni standardni oksimi. Pet hidrokspiridinskih oksima testiranih u ovom radu međusobno se razlikuju u duljini poveznice (četiri ili pet povezanih ugljikovih atoma) između dvaju navedenih, funkcionalno različitih, dijela oksima koja omogućava fleksibilnost cjelokupne molekule unutar aktivnog mjesta enzima. Dio molekule koji bi se trebao vezati na periferno anionsko mjesto enzima dodano se razlikuje između pet hidrokspiridinskih oksima: piperidinski prsten kod JR585, morfolinski prsten kod JR595 i RM048, 6,7-dimetoksi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolinski aromatski sustav kod GM415 i 6,7-dimetoksi-(1-(4-N,N-dimetilaminofenil)-1,2,3,4-tetrahidroizokinolinski aromatski sustav kod GM508. Strukture navedenih hidrokspiridinskih oksima su sažeto prikazane na **slici 5.1**. Nedavno je objavljena kristalna struktura kompleksa oksima RM048 i *TcAChE* (PDB: 6EWK) (**slika 5.2**)¹⁰² u kojoj je vidljivo da morfolinski prsten oksima doista ostvaruje nekovalentnu interakciju s perifernim anionskim mjestom enzima i usmjerava oksimsku skupinu prema serinu koji se nalazi na dnu ždrijela enzima.



Slika 5.1. Strukture hidrokspiridinskih oksima.

Nadalje, ranije je dokazana inhibicija enzima fosfiliranim piridinijevim aldoksimima, pogotovo u slučaju 4-aldoksima s oksimskom skupinom u *para*-položaju.¹⁹¹ Stoga, dodatna prednost ove

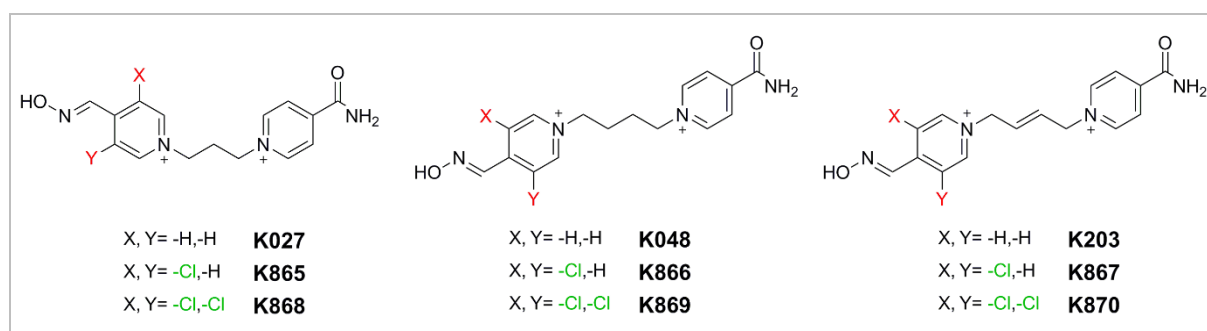
skupine oksima je postojanje hidroksilne skupine u α -poziciji na položaju 3 piridinskog prstena koja omogućava naknadnu intramolekularnu ciklizaciju fosfiliranog oksima pri čemu nastaje izoksazol koji ne inhibira AChE enzim poput fosfiliranih oksima.¹⁹²



Slika 5.2. Kristalna struktura kompleksa RM048 oksima i TcAChE (PDB: 6EWK) preuzeta iz ref. 102.

Druga skupina novosintetiziranih oksima, klorpiridinijevi oksimi, sintetizirani su po uzoru na prije sintetizirane piridinijeve oksime K027, K048 i K203, koji su se pokazali učinkovitim reaktivatorima AChE inhibirane OP spojevima⁵²⁻⁵⁹ te su pokazali značajno poboljšanje u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom *in vitro* i *in vivo* kada se uspoređi sa standardnim oksimima.^{56,58} Oksimi K027, K048 i K203 nisu pokazali citotoksičan učinak na više testiranih staničnih linija (jetra, bubreg, krvne stanice, ovariji)⁵⁶ i njihova akutna toksičnost u miševa je bila manja od akutne toksičnosti oksima TMB-4 (LD_{50} : K048>K027>K203).^{56,58} Međutim, zbog stalnog pozitivnog naboja je oksim K027 pokazao nisku penetraciju kroz KMB-u na modelu štakora.¹⁹³ Također, oksimi K027 i K048 su pokazali da prolaze u mozak u manjoj mjeri od obidoksima, ali je pokazano da čak i pri niskim koncentracijama mogu utjecati na aktivnost kolinske acetiltransferaze, enzima koji sudjeluje u sintezi ACh, u neuronima SŽS-a.¹⁴³ Također, oksimi K027 i K048 općenito pokazuju bolji zaštitni učinak od obidoksima *in vivo* kod trovanja paraoksonom i tabunom zbog veće učinkovitosti u reaktivaciji inhibirane AChE na periferiji.¹⁴³ Pretpostavlja se to može biti i posljedica učinka oksima K027 i K048 na

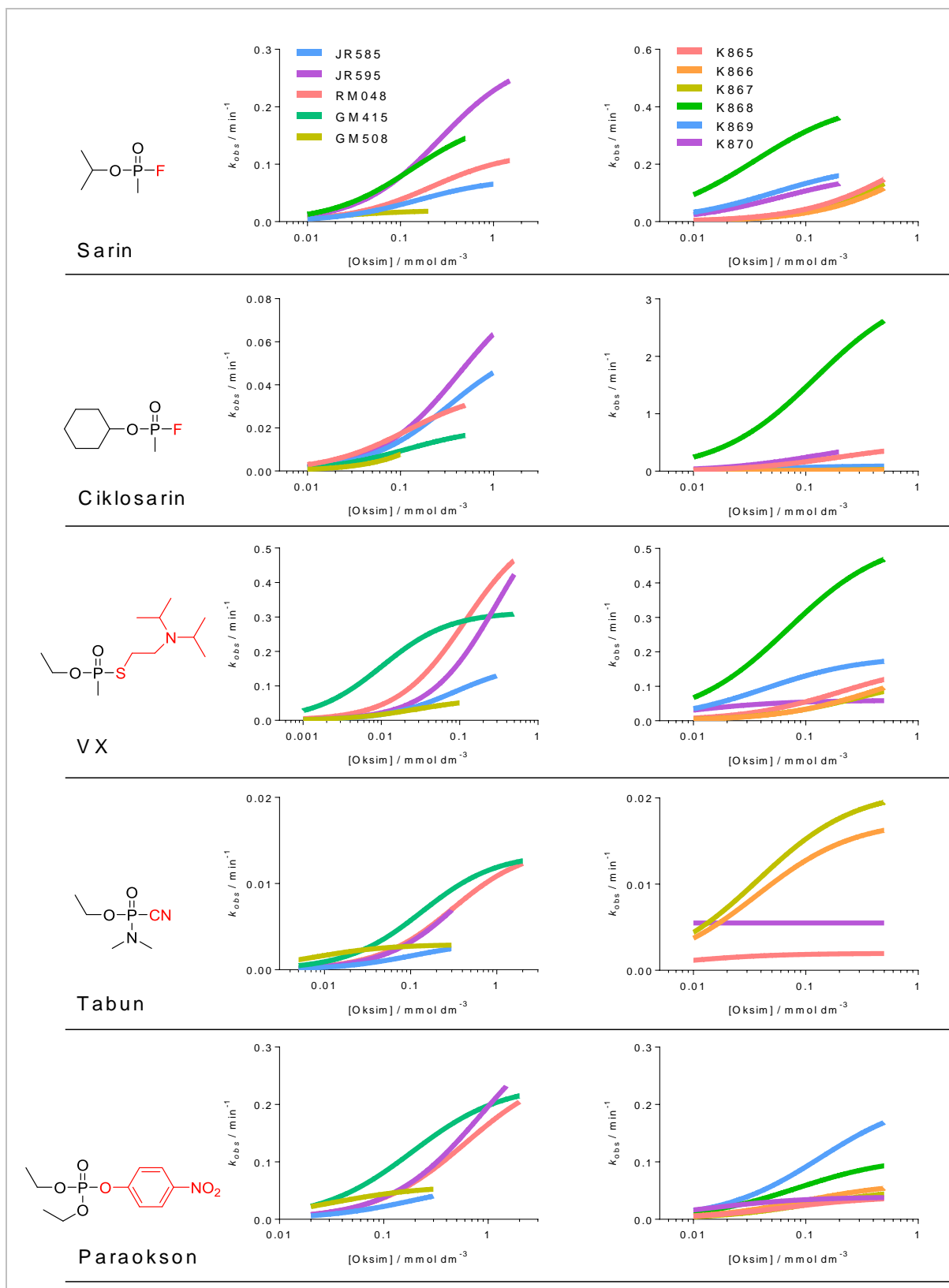
mAChR u parasimpatičkom živčanom sustavu i nAChR u autonomnim ganglijima u neuromuskularnim sinapsama.¹⁴³ Međutim, utvrđene koncentracije u mozgu nisu dovoljne za značajnu reaktivaciju inhibirane AChE u sinapsama SŽS-a.^{28,143} Kako bi se povećala lipofilnost i eventualno povećala sposobnost penetracije u SŽS, sintetiziran je analog oksima K203 s vezanim atomom fluora, oksim KR-22836.⁴⁸⁻⁵⁰ Smatra se da fluor povećava lipofilnost spojeva i u PAMPA testu je doista pokazano da se penetracija oksima s vezanim fluorom povećava s povećanjem broja atoma fluora u strukturi oksima.⁴⁹ KR-22836 je pokazao nešto veću zaštitu SŽS-a u usporedbi sa samim K203, ali nije pokazao veći stupanj reaktivacije inhibirane AChE u mozgu što sugerira da je povećana zaštita vjerojatno rezultat direktnog utjecaja KR-22836 na neke druge farmakološke mete u SŽS-u.⁵⁰ Stoga su novosintetizirani klorpiridinijevi oksimi, analozi potentnih reaktivatora K027, K048 i K203 na čije je strukture dodan jedan (K865, K866, K867) ili dva (K868, K869, K870) atoma klora na položaj 3, odnosno položaje 3 i 5 piridinijevog prstena s oksimskom skupinom (slika 5.3). Navedeni oksimi se međusobno razlikuju prema vrsti poveznice koja povezuje dva piridinijeva prstena: oksimi K865, K868, K027 i TMB-4 imaju propilensku, oksimi K866, K869, K048 i K074 butilensku, a oksimi K867, K870, K203 i K075 imaju but-2-ensku poveznicu.



Slika 5.3. Analogni oksimi koji se razlikuju u supstituentima (-H ili -Cl) na položajima 3 i 5 piridinijevog prstena.

Farmakološki potencijal pojedinačne skupine oksima analiziran je procjenom njihovog farmakodinamičkog i farmakokinetičkog profila. Farmakodinamički tj. reaktivacijski potencijal pojedinih oksima ustanovljen je određivanjem reaktivacijskih parametara kinetičkim pokusima te je taj reaktivacijski potencijal povezan sa strukturnim karakteristikama pojedinih oksima. Reaktivacijski potencijal proizlazi iz nukleofilnog potencijala oksima, koji ovisi o kiselo-baznoj konstanti disocijacije oksimske skupine (K_a) i za koju je preporučeno da bude u rasponu između 7,3 i 8,0.²⁶ Za hidroksipiridinske oksime pokazano je da pK_a vrijednosti oksimske skupine između 8,0 i 8,2 zbog čega je pretpostavljeno da imaju umjereni nukleofilni potencijal. Kod klorpiridinijevih oksima pK_a vrijednosti su bile niže (7,53 – 7,68) što osigurava

ostvarivanje većeg udjela nukleofilnijeg oblika oksima (oksimata) pri fiziološkom pH 7,4 od analognih piridinijevih oksima bez atoma klora, a istovremeno i veći nukleofilni potencijal klorpiridinijevih oksima u odnosu na hidropiridinske oksime. Dodatno, svi hidropiridinski oksimi i klorpiridinijevi oksimi su inhibirali kolinesteraze s konstantama disocijacije oksim-enzim kompleksa, K_i , u mikromolarnom području. Afinitet AChE prema oksimima kretao se redom GM508 > JR585 > GM415 > JR595 > RM048, dok je kod klorpiridinijevih oksima afinitet AChE rastao proporcionalno povećanju broja atoma klora vezanih na piridinijev prsten. Obično fosfilirani enzim ima niži afinitet od neinhibiranog enzima prema oksimima zbog toga što nastali konjugat sprječava interakcije koje oksimom ostvaruje sa slobodnim enzimom,^{194–196} te je afinitet svih testiranih fosfiliranih AChE bio niži od afiniteta nefosfilirane AChE prema tri hidropiridinska oksima (JR585, JR595, GM508) i svim klorpiridinijevim oksimima osim K865. Općenito je reaktivacija pomoću hidropiridinskih oksima bila najučinkovitija u slučaju AChE fosfilirane VX-om, paraoksonom i sarinom zbog visokih maksimalnih brzina reaktivacije (k_{+2} od 0,3 do 0,7 min⁻¹), a koje su kod reaktivacije AChE fosfilirane ciklosarinom i tabunom bile niže (k_{+2} od 0,01 do 0,1 min⁻¹). Hidropiridinski oksimi su imali visoke brzine reaktivacije i u slučaju BChE fosfilirane ciklosarinom (k_{+2} do 0,5 min⁻¹), umjerene kod reaktivacije BChE fosfilirane VX-om i paraoksonom (k_{+2} do ~ 0,1 min⁻¹), a za sarin i tabun je njihov reaktivacijski potencijal bio slab. Najbolji reaktivacijski potencijal u reaktivaciji oba enzima inhibirana većinom OP spojeva pokazali su oksimi JR595, RM048 i GM415 i to je vidljivo na **sluci 5.4.** gdje je prikazana ovisnost brzina reaktivacije fosfilirane AChE o koncentraciji pojedinog hidropiridinskog oksima. Molekulskim pristajanjem oksima JR595, RM048 i GM415 u konjugate VX-AChE ili VX-BChE predviđene su nekovalentne interakcije koje mogu biti uzrokom različitih afiniteta ovih konjugata enzima prema navedenim oksimima (vidi **tablicu 4.5**). Visok afinitet AChE inhibirane VX-om prema oksimu GM415 ($K_i = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$) može se objasniti predviđenom interakcijom njegove 6,7-dimetoksi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolinske skupine s Trp286 na perifernom anionskom mjestu AChE te se čini da je taj visok afinitet glavni razlog iznimno visokog ukupnog reaktivacijskog potencijala GM415 za AChE inhibiranu VX-om. Analogno, kod BChE na odgovarajućem mjestu se nalazi alanin, mala alifatska aminokiselina koja ne može stabilizirati oksim nekovalentnim interakcijama. Stoga je afinitet inhibirane BChE za GM415 oko 13 puta niži od afiniteta inhibirane AChE što rezultira slabijim ukupnim reaktivacijskim potencijalom za inhibiranu BChE (k_r (AChE/BChE) ~ 40).



Slika 5.4. Odnos ovisnosti konstanti brzine reaktivacije (k_{obs}) AChE inhibirane različitim OP spojevima o koncentraciji pojedinih hidroksipiridinskih (lijevo) i klorpiridinijevih (desno) oksima.

Međutim, i u kristalnoj strukturi neinhibiranog enzima *TcAChE* u kompleksu s RM048 je uočena nekovalentna interakcija između morfolinskog prstena oksima i perifernog anionskog mjesta enzima (**slika 5.2**), a unatoč tome je afinitet AChE prema RM048 bio tek umjeren ($K_i = 170 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Takva interakcija nije predviđena u modeliranom kompleksu oksima RM048 i AChE inhibirane VX-om, ali je afinitet AChE inhibirane VX-om prema RM048 ($K_i = 120 \mu\text{mol dm}^{-3}$) ostao približno jednak afinitetu neinhibiranog enzima. Stoga se čini da afinitet AChE prema nekom od hidropiridinskog oksimu nije isključivo rezultat interakcije oksima s perifernim anionskim mjestom enzima. Za oksim JR595 s najkraćom poveznicom i morfolinskim prstenom također nije predviđena interakcija s perifernim anionskim mjestom AChE inhibirane VX-om, ali je on imao najveću maksimalnu brzinu reaktivacije ($k_{+2} = 0,7 \text{ min}^{-1}$) za taj konjugat. Povoljan ukupan reaktivacijski potencijal pojedinih hidropiridinskih oksima nije produkt isključivo visokog afiniteta prema enzimu, što je pokazano i u slučaju oksima GM508 prema kojem su oba enzima, neinhibirana i inhibirana AChE imala najveći afinitet, a koji je pokazao loš reaktivacijski potencijal temeljem k_{+2} konstanti. Iz navedenog proizlazi da interakcija oksima s perifernim anionskim mjestom nije preduvjet za velik afinitet enzima prema oksimu, kao ni da velik afinitet enzima prema oksimu nije preduvjet za uspješnu reaktivaciju.

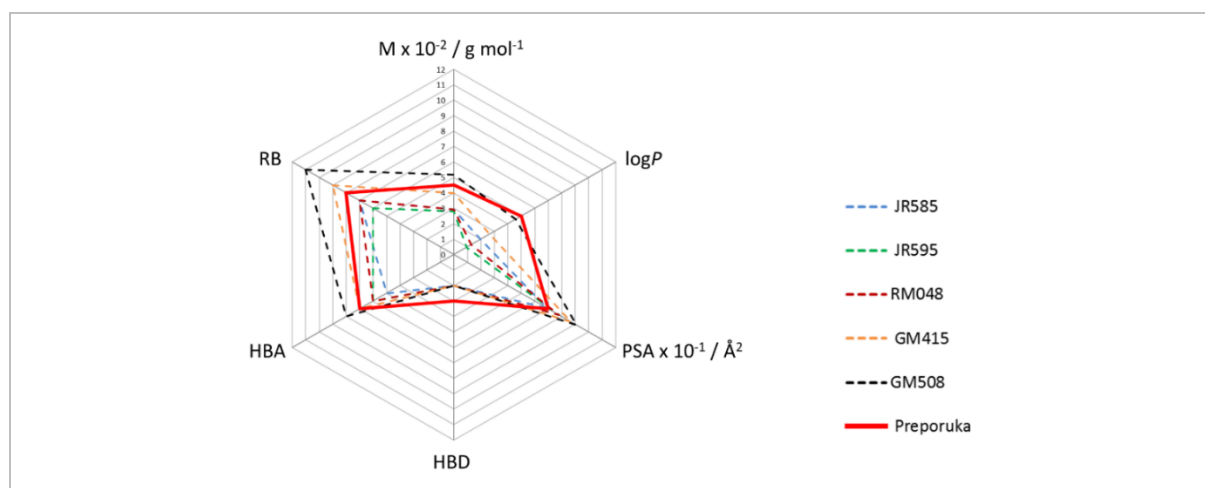
Pojedini klorpiridinijevi oksimi pokazali su se vrlo učinkovitim reaktivatorima u slučaju fosfilirane AChE zbog visokih maksimalnih brzina reaktivacije, ali i visokog afiniteta inhibiranog enzima prema oksimima (**tablica 4.16 – 4.20**) te je ovisnost brzine reaktivacije o koncentraciji pojedinog oksima prikazana na **slici 5.4**. Izuzetno potentan klorpiridinijev reaktivator bio je 3,5-diklorpiridinijev oksim s propilenskom poveznicom između piridinijevih prstena, oksim K868; primarno u reaktivaciji AChE inhibirane ciklosarinom, VX-om i sarinom, a manje u reaktivaciji AChE inhibirane paraoksonom. S druge strane, za AChE inhibiranu tabunom je K868 bio potpuno neučinkovit i općenito su 3-klorpiridinijevi oksimi bili učinkovitiji reaktivatori AChE inhibirane tabunom od 3,5-diklorpiridinijevih oksima. Analizom reaktivacijskih parametara analognih piridinijevih oksima s propilenskom poveznicom koji se razlikuju u broju atoma klora vezanih na piridinijev prsten s oksimskom skupinom (K027 bez klora, K865 s jednim klorom i K868 s dva klora) pokazano je da afinitet AChE inhibirane sarinom, ciklosarinom i VX-om raste s brojem atoma klora vezanih na piridinijev prsten što je istovremeno uzrok i analognog rasta ukupnog reaktivacijskog potencijala. U slučaju AChE inhibirane paraoksonom i tabunom, najveći afinitet je uočen za oksim s jednim klorom (K865).

Analizom modeliranih kompleksa AChE inhibirane ciklosarinom ili tabunom i istih analognih piridinijevih oksima K027, K865 i K868, nisu ustanovljene značajne razlike u smještanju oksima koje bi mogle objasniti razlike u njihovom reaktivacijskom potencijalu. Također, za oksim K868 se predviđa stvaranje nekovalentnih interakcija između njegova dva atoma klora vezanih na piridinijev prsten i aminokiselina ždrijela u modeliranim kompleksima s oba konjugata AChE (inhibirana ciklosarinom i tabunom). Prema rezultatima reaktivacije, može se zaključiti da navedene interakcije između K868 i inhibiranog enzima mogu rezultirati stabilizacijom oksima u produktivnoj konformaciji, pogodnoj za učinkovitu reaktivaciju, kao što je slučaj u reaktivaciji AChE inhibirane ciklosarinom, ili pak iste interakcije mogu stabilizirati oksim u neproduktivnoj konformaciji kao što je slučaj za smještanje u ždrijelu AChE inhibirane tabunom. Navedeno potvrđuje važnost utjecaja OP ostataka vezanog za serin na uspješnost reaktivacije pojedinim oksimom te ukazuje na to koliki je izazov pronaći univerzalno učinkovit reaktivator.

Budući da se BChE uglavnom nalazi u plazmi, određivanje reaktivacije BChE inhibirane OP spojevima služi kao procjena mogu li se oksimi smatrati korisnima za pseudokatalitičko razgrađivanje OP spojeva u krvi.^{10,197} Međutim, BChE inhibirana OP spojevima i dalje je izazov za reaktivaciju te je u opsežnoj analizi reaktivacijskog potencijala širokog spektra kvaternih piridinijevih oksima pokazano da nijedan testirani oksim nije perspektivni reaktivator fosfilirane BChE.¹⁸⁷ To je pokazano i za ovdje testirane klorpiridinijeve oksime. S druge strane, hidroksipiridinski oksimi pokazali su određenu učinkovitost u reaktivaciji fosfilirane BChE, pogotovo za slučaj BChE inhibirane ciklosarinom, a zatim i VX-om i paraoksonom. Oksimi JR595 i GM415, kao predstavnici potentnih hidroksipiridinskih reaktivatora, pokazali su učinkovitu pseudokatalitičku razgradnju OP spojeva (VX, sarin, ciklosarin i paraokson) u punoj krvi *ex vivo*.¹⁰²

Nadalje, analizom lipofilnosti, polarnosti i fleksibilnosti oksima može se procijeniti njihova distribucija u organizmu, prije svega prolazak kroz KMB-u. Iako hidroksipiridinski oksimi pri fiziološkom pH imaju uglavnom protonirani tercijarni atom dušika, oni istovremeno stvaraju i udio neioniziranih molekulskih vrsta za koje se očekuje brži pasivni transport kroz membrane. A osim toga, oksimi s protoniranim tercijarnim atomom dušika mogu preko interakcije s negativno nabijenim fosfolipidima membrane biti uneseni u membranu gdje dolazi do smanjena pK_a vrijednosti tercijarne amino skupine i do otpuštanja protona što omogućava

prolazak molekule na drugu stranu membrane.¹⁹⁸ Općenito, predviđena lipofilnost hidrokspiridinskih spojeva, potvrđena i eksperimentalno (Chrom $\log D_{7,4}$ od 1,0 do 5,0), navodi na zaključak da se mogu ostvariti povoljne interakcije između ovih oksima i fosfolipidnog dvosloja bitne za prijenos molekule kroz membranu. Za prolazak kroz membranu je bitna i umjerena fleksibilnost molekule ($RB < 8$), što većina hidrokspiridinskih oksima zadovoljava, tj. nije preniska da ne dozvoljava kretanje molekule kroz membranu, ali ni prevelika da se prilagođava i ulazi u čvrste interakcije s lipidnim lancima dvosloja koji onemogućavaju izlazak iz membrane. Iako većina hidrokspiridinskih oksima ima povoljan broj donora i akceptora vodikovih veza, svi imaju vrijednosti ukupne polarne površine molekule jednaku ili nešto veću od gornje granice preporučenog raspona ($60 - 70 \text{ \AA}^2$).¹⁵³ Međutim, u konačnici svi oksimi, osim oksima GM508, zadovoljavaju većinu kriterija za lijekove koji pokazuju djelovanje u SŽS-u, a koji se temelje na definiranim gornjim graničnim vrijednostima najbitnijih fizikalno-kemijskih svojstava,¹⁵³ kako je i prikazano na **slici 5.5**. Također, algoritam koji su predstavili Wager i suradnici^{199–201} koristan je za procjenu potencijala da molekula pokazuje farmakološki učinak u SŽS-u te se temelji na pojedinačnom bodovanju različitih fizikalno-kemijskih svojstava ($\log P$, $\log D$, TPSA, M, HBD i pK_a), a produkt tog bodovanja označava se kao *CNS MPO* (*Central Nervous System Multi-Parameter Optimization*) i nalazi se u rasponu 0 – 6. Prema njemu su svi hidrokspiridinski oksimi povoljno bodovani, tj. imaju $CNS MPO \geq 4$ (**tablica 5.1**), osim oksima GM508, te se stoga procjenjuje da većina hidrokspiridinskih oksima ima visoku vjerojatnost prolaska kroz KMB-u.



Slika 5.5. Fizikalno-kemijska svojstva hidrokspiridinskih oksima (molarna masa, M; koeficijent lipofilnosti, $\log P$; područje polarne površine, PSA; broj donora i akceptora vodikovih veza, HBD i HBA; broj veza koje se rotiraju, RB) određenih *in silico* u odnosu na preporučene vrijednosti tih svojstava (crvenom linijom označena gornja granična vrijednost) za lijekove s djelovanjem u SŽS-u.¹⁵³

Mogućnost pasivnog transporta hidroksipiridinskih oksima testiran je i *in vitro* metodom određivanja prolaska kroz umjetnu membranu od ekstrakta lipida iz svinjskog mozga u tzv. PAMPA testu (engl. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) u suradničkom laboratoriju u Barceloni, Španjolska.¹⁰² Pokazano je da svi hidroksipiridinski oksimi imaju visoke brzine penetracije kroz membranu ($6 - 30 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) (**tablica 5.1**) što je poboljšanje u odnosu na standardne oksime HI-6 i 2-PAM koji u sličnom PAMPA testu postižu niske brzine penetracije kroz membranu ($< 3 \cdot 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$).²⁰²

Tablica 5.1. Produkt bodovanja različitih fizikalno kemijskih svojstava hidroksipiridinskih oksima (CNS MPO)^a te permeabilnost oksima (P_e) kroz umjetnu membranu određena PAMPA testom.^b

Oksim	CNS MPO	$P_e (10^{-6} \text{ cm s}^{-1})$
JR585	4,5	$30,1 \pm 5,5$ (SŽS +)
JR595	5,5	$6,1 \pm 0,5$ (SŽS +)
RM048	5,5	$8,1 \pm 0,31$ (SŽS +)
GM415	4,5	$12,1 \pm 1,9$ (SŽS +)
GM508	2,1	$12,8 \pm 1,5$ (SŽS +)

^aFizikalno-kemijska svojstva (M, TPSA, HBD, HBA, RB, $\log P$, pKa vrijednosti tercijarne amino skupine) bodovana prema ref. 199 – 201; lijekovi s djelovanjem u SŽS-u imaju CNS MPO ≥ 4 (skala 0 – 6); ^bSpojevi s visokom brzinom penetracije ($P_e > 5,157 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) označeni su kao (SŽS +). Podaci iz ref. 102.

Iako je prema *in silico* određenim vrijednostima fizikalno-kemijskih svojstava hidroksipiridinskih oksima utvrđeno da oksimi JR585, JR595 i RM048 imaju najveću vjerojatnost prolaska kroz KMB-u pasivnim transportom, brzina penetracije u *in vitro* testu bila je redom: JR585 > GM508 ~ GM415 > RM048 > JR595. Brzina penetracije u PAMPA testu više je korelirala s *in vitro* određenim Chrom $\log D_{7,4}$ vrijednostima, izuzev oksima JR585 koji je imao najmanju vrijednost koeficijenta lipofilnosti (1,23), ali s druge strane i najmanju vrijednosti ukupnog područja polarne površine (69 \AA^2) što je vjerojatno rezultiralo pokazanom najbržom brzinom penetracije u PAMPA testu. Međutim, potrebno je naglasiti da PAMPA test pokazuje isključivo brzinu pasivnog transporta kroz lipidni dvosloj što izostavlja doprinos aktivnih transporterata ili pumpi kojima je KMB bogata i koji u organizmu sudjeluju u prijenosu čitavog niza supstrata u ili iz mozga.^{145–147} Analizom fizikalno-kemijskih svojstava klorpiridinijevih oksima i eksperimentalno određenom lipofilnosti piridinijevih oksima (Chrom $\log D_{7,4} < -0,32$) utvrđeno je da se zbog kvaternog atoma dušika (pozitivnog naboja) ne postiže značajno povećanje lipofilnosti klorpiridinijevih oksima u odnosu na analogne oksime bez klora, odnosno oni i dalje imaju hidrofilni karakter što otežava prolazak molekule kroz KMB-u. Rezultati PAMPA ispitivanja klorpiridinijevih oksima, napravljenog u suradničkom laboratoriju u Hradec Králové, Češka Republika, prikazani su u **tablici 5.2**. Klorpiridinijevi oksimi pokazuju 3 – 6 puta veću brzinu penetracije preko membrane od analognih piridinijevih

oksima bez klora ili standardnih piridinijevih oksima 2-PAM i HI-6, ali i najmanje dva puta nižu od hidroksipiridinskih oksima. Oksimi s but-2-enskom poveznicom između piridinijevih prstenova pokazali su najveće brzine permeabilnosti u odnosu spojeve s propilenskom i butilenskom poveznicom u strukturi. Stoga, iako su klorpiridinijevi oksimi pokazali poboljšanje reaktivacijske učinkovitosti AChE inhibirane većinom OP spojeva, ne predviđa se da bi oni ostvarili značajno više koncentracije u mozgu od onih pokazanih za standardne oksime (maksimalno 10 % koncentracije u krvi).¹⁷³ S obzirom na navedene rezultate, od dviju skupina novosintetiziranih oksima, kao perspektivnija skupina reaktivatora koja bi mogla pokazati učinkovitiju reaktivaciju inhibirane AChE u mozgu u odnosu na standardne oksime, odabrana je skupina hidroksipiridinskih oksima i provedena su daljnja ispitivanja.

Tablica 5.2. Permeabilnost (P_e) klorpiridinijevih i piridinijevih oksima bez klora kroz umjetnu membranu određena PAMPA testom.^a

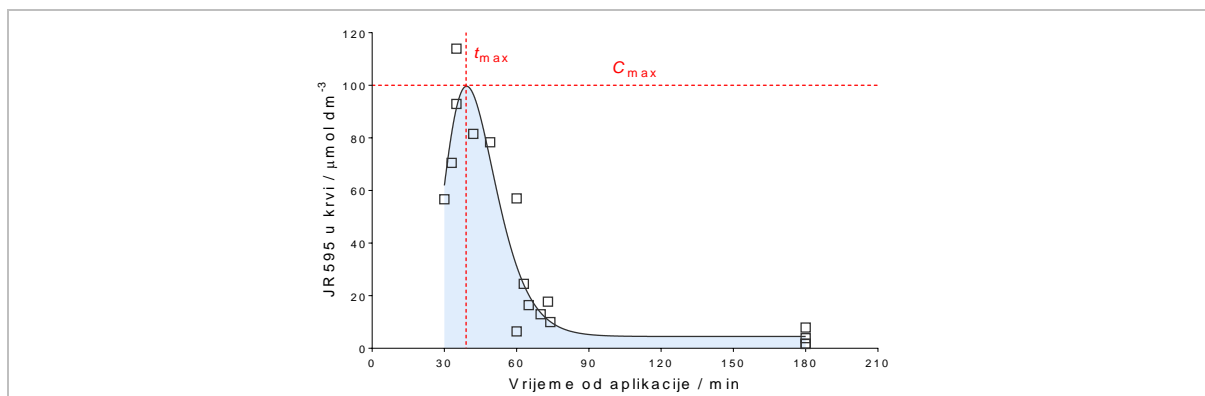
Oksim	P_e (10^{-6} cm s ⁻¹) ^b
K865	1,40 ± 0,17 (SŽS -)
K866	1,00 ± 0,12 (SŽS -)
K867	2,60 ± 0,23 (SŽS +/-)
K868	1,73 ± 0,20 (SŽS -)
K869	1,40 ± 0,14 (SŽS -)
K870	2,21 ± 0,32 (SŽS +/-)
K027	0,33 ± 0,03 (SŽS -)
K048	0,34 ± 0,08 (SŽS -)
K203	0,45 ± 0,04 (SŽS -)
2-PAM	0,36 ± 0,16 (SŽS -)
HI-6	0,84 ± 0,19 (SŽS -)

^aPodaci iz ref. 173; ^bSpojevi s niskom, srednjom ili visokom penetracijom označeni su kao (SŽS -), (SŽS +/-), odnosno (SŽS +).

Budući da je potvrđena visoka lipofilnost hidroksipiridinskih oksima, moguće je očekivati određenu akumulaciju tih oksima u tkivima, pa temeljem toga i da pokazuju veći toksični potencijal od standardnih oksima. U nekoliko staničnih linija je ispitan citotoksični učinak nakon 24-satnog tretmana s najučinkovitijim reaktivatorima (JR595, RM048 i GM415). Jedino je oksim GM415 pokazao citotoksičan učinak pri *in vivo* relevantnim nižim mikromolarnim koncentracijama ($IC_{50} = 100 - 160 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Dodatno, kako bi se utvrdilo hoće li nova potencijalna terapija trovanja OP spojevima imati sinergističan ili antagonističan učinak na jedan od sekundarnih mehanizama neurotoksičnosti uzrokovanih OP trovanjem - oksidacijski stres, u staničnim linijama SH-SY5Y i 1321N1, kao stanicama koje pretežito nalazimo u SŽS-u, ispitano je povećanje indukcije ROS spojeva uslijed tretmana s oksimima u odnosu na netretirane stanice. S obzirom da je pokazana povećana indukcija ROS vrsta u staničnim linijama uslijed tretmana oksimima JR595, RM048 i GM415 u odnosu na netretirane stanice,

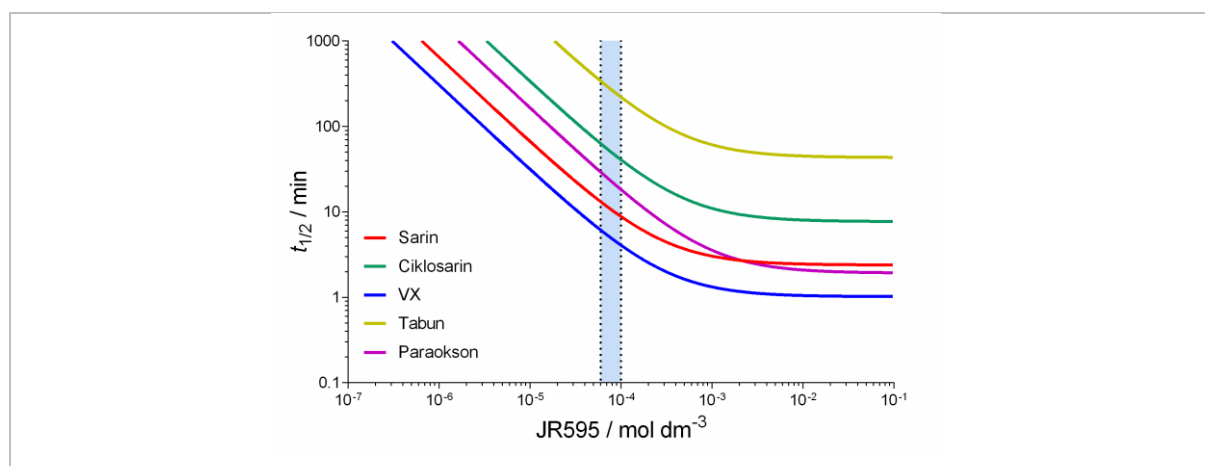
gdje GM415 pokazuje daleko najveću indukciju, potrebno je u budućnosti dodatno analizirati i provjeriti utjecaj izazvanog oksidacijskog stresa te može li se stanica oduprijeti tim količinama ROS spojeva pomoću vlastitog antioksidacijskog sustava. Dalje, a obzirom da su lipofilni lijekovi često supstrati CYP450 metaboličkih enzima u jetri, ¹³³ testirala se i metabolička stabilnost hidroksipiridinskih oksima inkubacijom s ljudskim mikrosomima. S obzirom na rezultate, oksimi JR595 i RM048 su se pokazali metabolički stabilnim spojevima, JR585 i GM415 metabolički umjereno stabilnim spojevima, a GM508 izuzetno metabolički nestabilnim spojem. Veća metabolička stabilnost je bitna za dulje održavanje postignutih koncentracija oksima u organizmu te su prema tome oksimi JR595 i RM048 najpovoljniji za primjenu u terapiji.

Konačan odabir vodećeg reaktivatora iz hidroksipiridinske skupine temeljio se prvenstveno na rezultatima *in vitro* reaktivacije fosfilirane AChE prema kojima su izdvojena tri obećavajuća reaktivatora: JR595, RM048 i GM415. Dalje, analizom *in silico* vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava ovih oksima je zaključeno da oksimi JR595 i RM048 imaju najpovoljnija svojstva za prolazak kroz KMB-u, prvenstveno zbog najvećeg udjela neioniziranih mikrospecija koje ostvaruju pri fiziološkom pH te manje polarnosti molekula. Budući da je oksim GM415 brže difundirao kroz umjetnu membranu *in vitro* u PAMPA testu, rezultati testiranja citotoksičnog potencijala i indukcije oksidacijskog stresa u staničnim linijama dodatno poslužili su za eliminaciju GM415 kao kandidata za daljnje testiranje antidotskog potencijala. Nadalje, kako je pokazano da visok afinitet inhibiranog enzima prema oksimu nije preduvjet za uspješnu i brzu reaktivaciju, za daljnja testiranja odabran je oksim JR595 koji je u *in vitro* testovima ostvario najveće maksimalne brzine reaktivacije fosfiliranih kolinesteraza.



Slika 5.6. Ovisnost koncentracije JR595 u krvi o proteklom vremenu od *i.m.* primjene (100 mg kg^{-1}) s naznačenom ostvarenom maksimalnom koncentracijom (C_{max}) i vremenom potrebnom za postizanje te koncentracije (t_{max}).

Daljnje testiranje antidotskog potencijala oksima JR595 je uključivalo preliminarno ispitivanje njegovog farmakokinetičkog profila na modelu miša za što je pripravljena TFA sol oksima JR595 povećane topljivosti u fiziološkoj otopini. Spoj je apliciran *i.m.* u dozi od 100 mg kg^{-1} , dozi koja nije uzrokovala znakove toksičnosti u miševa. Ovisnost koncentracije JR595 u krvi o proteklom vremenu od aplikacije je pokazala uobičajen profil za *i.m.* primjenu lijekova (slika 5.6).



Slika 5.7. Ovisnost poluvremena $t_{1/2}$ za postizanje maksimalne reaktivacije fosfilirane AChE o koncentraciji oksima JR595. Plavo označeno područje su koncentracije JR595 između 60 i $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Maksimalna koncentracija u krvi (C_{max}) od oko $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ostvarena je 39 minuta od aplikacije. Vidljivo je da lipofilnost JR595 nije uzrokovala značajno sporiju apsorpciju iz mišića u krv kako bi se možda moglo očekivati kada se uspoređi s farmakokinetičkim profilima *i.m.* primijenjenih standardnih oksima s većom topljivošću u vodi.²⁰³ Ovi preliminarni rezultati farmakokinetike oksima JR595 su omogućili daljnju analizu terapijskog potencijala oksima JR595 u periodu od 30. do 50. minute cirkulacije kada je koncentracija JR595 bila najveća, tj. između 60 i $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Prema reaktivacijskim parametrima analizirana je ovisnost poluvremena reaktivacijskog maksimuma o koncentraciji oksima kako je prikazano na **slici 5.7**.^{80,204} Smatra se da je za oporavak od trovanja OP spojem dovoljna reaktivacija 30 % enzima u krvi u što kraćem vremenu te su određena vremena potrebna za postizanje tog postotka reaktivacije AChE (na koju otpada 80 % aktivnosti kolinesteraza u krvi)¹⁰² s koncentracijama 60 i $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ovisno o OP spoju (**tablica 5.3**). Zaključeno je da bi se terapijski učinak oksima JR595 kod trovanja VX-om, sarinom i paraoksonom mogao ostvariti u vremenu od 2 – 20 minuta, a kod trovanja ciklosarinom u 20 – 30 minuta. Jedino bi u slučaju tabuna reaktivacijski učinak oksima JR595 bio preslab s obzirom na prikazani farmakokinetički profil,

te bi za postizanje terapijskog učinka bilo potrebno održavati navedene koncentracije duže od 3 sata, što bi bilo moguće tek višestrukom primjenom oksima.

Tablica 5.3. Maksimalna reaktivacija AChE u *in vitro* pokusima ($Reakt_{max}$, %), poluvrijeme postizanja $Reakt_{max}$, $t_{1/2}$, i vrijeme potrebno da se reaktivira 30% AChE, t_{30} ,^a s 60 i 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ koncentracijama JR595.

OP spoj	VX	Sarin	Paraokson	Ciklosarin	Tabun
$Reakt_{max}$ / %	100	100	80	100	80
60 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ JR595					
$t_{1/2}$ / min	6	13	30	63	340
t_{30} / min	3,1	6,7	20,3	32,4	230
100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ JR595					
$t_{1/2}$ / min	4	9	18	41	221
t_{30} / min	2,1	4,6	12,2	21,1	150

^aKada je $Reakt_{max} = 100$ %, onda je $t_{30} = t_{1/2} * 0,514$, odnosno kada je $Reakt_{max} = 80$ % onda je $t_{30} = t_{1/2} * 0,678$.

Oksim JR595 je postigao koncentracije u mozgu koje iznose 6 – 26 % koncentracije spoja u krvi što tek donekle pokazuje mogućnost određenog poboljšanje u reaktivaciji inhibirane AChE u mozgu u odnosu na standardne oksime za koje je pokazano da u mozgu ostvaruju maksimalno 10 % njihove koncentracije u krvi.^{27,29,30} Budući da su ostvarene koncentracije u mozgu niže od očekivanih, potrebno je dodatno ispitati mogućnost da je oksim JR595 supstrat transportnih pumpi (pr. P-gp) koje izbacuju širok spektar molekula iz mozga u krv i time umanjuje njihov učinak u mozgu. Tom problemu moglo bi se doskočiti korištenjem inhibitora P-gp pumpi.²⁰⁵ Također, veća reaktivacija AChE inhibirane paraoksonom u mozgu štakora uočena je nakon primjene GM415 uklopljenog u nanočestice (30 % kroz 5 sati) u odnosu na reaktivaciju nakon primjene slobodnog oksima GM415 (< 5%).²⁰⁶

Iz cjelokupnog istraživanja mogu se izvesti određeni zaključci i preporuke za daljnji razvoj i dizajn novih reaktivatora. Teoretski izvedene preporuke za vrijednosti reaktivacijskih parametara jesu da afinitet prema reaktivatoru treba biti umjeren ($K_{OX} < 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), a ostvarene maksimalne brzine reaktivacije, k_{+2} , veće od $0,1 \text{ min}^{-1}$.²⁰⁷ Afinitet fosfiliranih AChE za JR595 je bio od najveći u slučaju inhibicije VX-om i sarinom ($K_{OX} \sim 300 \mu\text{mol dm}^{-3}$) te bitno niži u slučaju ostalih OP spojeva. Međutim, zbog visokih brzina maksimalne reaktivacije (od $0,1 - 0,7 \text{ min}^{-1}$) predviđa se dovoljan terapijski učinak kod svih OP spojeva osim tabuna. Poboljšanje u smislu povećavanja afiniteta pružilo bi mogućnost ili duljeg djelovanja oksima *in vivo* ili primjene nižih doza oksima. Za postizanje većih brzina pasivnog transporta hidropiridinskih oksima kroz KMB-u trebalo bi sniziti polarnost molekule. Konačno, iako se od hidrofилnih klorpiridinijevih oksima ne očekuje ostvarivanje visokih koncentracija u mozgu, njihov reaktivacijski potencijal predstavlja napredak u odnosu na postojeće piridinijeve

oksimima. Stoga, dodatak klora na piridinijev prsten s oksimskom skupinom, koji omogućava sniženje pK_a vrijednosti oksimske skupine te povećanje nukleofilnog potencijala oksima, svakako može biti preporuka u dizajnu novih serija reaktivatora. Međutim, sam dodatak klora ne rezultira nužno optimalnim smještanjem i stabilizacijom oksima u ždrijelu enzima inhibiranog različitim OP spojevima. U tome važnu ulogu ima i ostatak strukture, tj. ugljikov lanac između piridinijevih prstenova i na primjeru klopiridinijevih oksima testiranih u ovoj disertaciji je propilenski lanac bio znatno povoljniji od butilenskog ili but-2-enskog lanca za većinu testiranih OP spojeva, ali ne i za tabun. Iako je uočena indukcija oksidacijskog stresa klorpiridinijevim oksimima s propilenskom poveznicom u staničnim linijama živčanog sustava, daljnjem razvitku tih oksima pogoduje činjenica da ne pokazuju citotoksičnost pri farmakološki relevantnim koncentracijama, jednako kao ni njihov analog bez klora, K027.

In silico i *in vitro* detaljna evaluacija farmakološke učinkovitosti novosintetiziranih antidota za trovanje OP smatra se novim pristupom u analizi reaktivatora fosfiliranih AChE, kojim je omogućen racionalni odabir vodećeg oksima već u ranoj fazi istraživanja, prije *in vivo* testiranja. Takav pristup smanjuje mogućnost naknadnog uočavanja potencijalnih nedostataka novih reaktivatora u *in vivo* sustavu te usmjerava daljnji razvoj novih reaktivatora.

§ 6. ZAKLJUČAK

- Sveobuhvatnom analizom reaktivacijskih i farmakoloških karakteristika oksima u *in silico*, *in vitro* i *in vivo* uvjetima pokazan je potencijal i prednost novih skupina oksima u terapiji trovanja OP spojevima u odnosu na oksime koji se danas koriste u medicinskoj praksi.
- Najučinkovitiji reaktivator fosfilirane AChE iz skupine hidropsipiridinskih oksima je bio oksim 2[(hidroksiimino)metil]-6-[4-(morfolin-4-il)butil]piridin-3-ol (JR595) zbog najviših maksimalnih brzina reaktivacije. Molekulskim modeliranjem je pokazano da se oksim JR595 u aktivnom mjestu inhibiranog enzima smješta povoljno za nukleofilni napad. Također, JR595 ima fizikalno-kemijska svojstva povoljna za prolazak kroz KMB-u, nije citotoksičan u fiziološki relevantnim koncentracijama te nije podložan razgradnji CYP450 metaboličkim enzimima. U preliminarnom *in vivo* farmakokinetičkom ispitivanju na modelu miša potvrđen je prolazak JR595 u mozak (do 26 % koncentracije u krvi).
- Iz skupine klorpiridinijevih oksima, u reaktivaciji AChE inhibirane ciklosarinom, VX-om i sarinom posebno se ističe 4-karbamoil-1-(3-{3,5-dikloro-4-[(hidroksiimino)metil]piridinil}propil) piridinijev dibromid (K868) zbog visokog udjela nukleofilnije deprotonirane oksimske skupine te njezinog povoljnog smještanja u blizini fosfiliranog katalitičkog serina, stabiliziranog hidrofobnim- π -alkilnim interakcijama između atoma klora i aminokiselina aktivnog mjesta inhibiranog enzima. Lipofilnost klorpiridinijevih oksima nije značajno veća u odnosu na analogne piridinijeve oksime bez klora, a manja je od lipofilnosti hidropsipiridinskih oksima te se ne predviđa da će klorpiridinijevi oksimi postići visoke koncentracije u mozgu.
- U reaktivaciji fosfilirane BChE istaknuli su se hidropsipiridinski oksimi, posebice u slučaju ciklosarina, VX i paraoksona, kada su pokazali učinkovitiju reaktivaciju od oksima HI-6 ili 2-PAM. To ih čini potencijalnim kandidatima za pseudokatalitičko razgrađivanje OP spojeva u krvi.
- Na osnovu svih rezultata ove disertacije izgledno je da obje skupine oksima predstavljaju ishodne spojeve za daljnji razvoj antidota za učinkovitu reaktivaciju AChE

inhibirane raznim OP spojevima u perifernim neuromuskularnim sinapsama i krvi, a hidrosipiridinski oksimi imaju potencijal i za reaktivaciju AChE u mozgu.

- Ovakav pristup analizi novosintetiziranih reaktivatora omogućava bolji probir vodećih spojeva od uobičajene analize bazirane samo na reaktivacijskoj učinkovitosti oksima i stoga se preporuča prije *in vivo* testiranja u smislu uvažavanja općeprihvaćenih pravila za zaštitu životinja.

§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Kratica	Značenje
1321N1	adherentne glija stanice astrocitoma ljudskog mozga
2-PAM	2-[(hidroksiimino)metil]-1-metilpiridinijeva sol
ABC	transporter koji koristi ATP (engl. <i>ATP-binding cassette</i>)
AChE	acetilkolinesteraza
ADME	engl. <i>adsorption, distribution, metabolism, excretion</i>
AMT	transcitoza potaknuta adsorpcijom (engl. <i>adsorptive-mediated transcytosis</i>)
ATCh	acetiltiokolin jodid
ATP	adenozin-trifosfat
BChE	butirilkolinesteraza
BCRP	protein rezistencije na karcinom dojke (engl. <i>breast cancer resistance protein</i>)
BSA	albumin govedeg seruma (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CHARMm	<i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics</i>
CHI	kromatografski određen indeks hidrofobnosti
Chrom log <i>D</i>	log <i>D</i> određen <i>in vitro</i> kromatografskom analizom
Ciklosarin	O-cikloheksil-metilfosfonofluoridat
<i>Cl</i> _{int}	<i>in vitro</i> intrinzični klirens spoja
<i>Cl</i> _{in vivo}	predviđeni <i>in vivo</i> klirens spoja
<i>C</i> _{max}	maksimalna koncentracija spoja u krvi
CYP450	citokrom P450 enzimski sustav
DAM	3-(hidroksiimino)butan-2-on
DCFH-DA	2',7'-diklorofluorescin diacetat
DCF	2',7'-diklorofluorescin
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimetil-sulfoksid
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EMEM	engl. <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>

FBS	fetalni goveđi serum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
GABA	γ -aminomaslačna kiselina
GLUT1	engl. <i>glucose transporter 1</i>
GM415	6-[5-(6,7-dimetoksi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-2-il)pentil]-2-[(hidroksimino)metil]piridin-3-ol
GM508	6-(5-{1-[4-(dimetilamino)fenil]-6,7-dimethoksi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-2-il}pentil)-2-[(hidroksiimino)metil]piridin-3-ol
HBA	broj akceptora vodikovih veza (engl. <i>hydrogen bond acceptors</i>)
HBD	broj donora vodikovih veza (engl. <i>hydrogen bond donors</i>)
HepG2	adherentne epitelne stanice ljudskog hepatoma
HI-6	4-karbamoil-1-[(2-[(hidroksiimino)metil]piridinio}metoksi)metil]piridinijeva sol
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
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
JR595 TFA	JR595 sol trifluorooctene kiseline
K027	4-karbamoil-1-(3-{4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}propil)piridinijev dibromid
K048	4-karbamoil-1-(4-{4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}butil)piridinijev dibromid
K203	4-karbamoil-1-(4-{4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}but-2-enil)piridinijev dibromid
K865	4-karbamoil-1-(3-{3-klor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}propil)piridinijev dibromid
K866	4-karbamoil-1-(4-{3-klor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}butil)piridinijev dibromid
K867	4-karbamoil-1-[4-{3-klor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}but-2-enil]piridinijev dibromid
K868	4-karbamoil-1-(3-{3,5-diklor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}propil)piridinijev dibromid
K869	4-karbamoil-1-(4-{3,5-diklor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}butil)piridinijev dibromid
K870	4-karbamoil-1-[4-{3,5-diklor-4-[(hidroksiimino)metil]piridinio}but-2-enil]piridinijev dibromid
KMB	krvno-moždana barijera
LBF	predviđeni <i>in vivo</i> relativni hepatski klirens

LD ₅₀	doza spoja koja usmrtni 50 % ispitivane populacije
log <i>P</i>	koeficijent raspodjele tvari između oktanola i vode
log <i>D</i>	koeficijent raspodjele tvari između oktanola i vode ovisan o pH
M	molarna masa
mAChR	muskarinski acetilkolinski receptor
MDR	protein rezistencije na različite lijekove (engl. <i>multi-drug resistance</i>)
MEM	engl. <i>Minimum Essential Medium</i>
MINA	1-(hidroksiimino)propan-2-on
MM2	engl. <i>Molecular Mechanics 2</i>
MMFF94	engl. <i>Merck Molecular Forcefield 94</i>
MRP	protein povezan s rezistencijom na različite lijekove (engl. <i>multidrug-resistance related protein</i>)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
nAChR	nikotinski acetilkolinski receptor
NAD(P)H	reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid(fosfat)
OATP1A2	engl. <i>organic anion transporter family member 1A2</i>
Obidoksim	4-[(hidroksiimino)metil]-1-[(4-[(hidroksiimino)metil]piridinio)metoksi metil]piridinijev diklorid
OCT2	engl. <i>organic cation transporter family member 2</i>
OP	organofosforni spoj
Paraokson-etil	dietil-4-nitrofenil-fosfat
PEG	polietilenglikol
P-gp	P-glikoprotein
PK-15	adherentne epitelne stanice bubrega svinje
PMS	fenazin-metosulfat
PRiMA	transmembranski protein koji veže AChE za membrane (engl. <i>proline-rich membrane anchor</i>)
PSA	područje polarne površine (engl. <i>polar surface area</i>)
RB	veze koje se mogu rotirati (engl. <i>rotatable bonds</i>)
RM048	2-[(hidroksiimino)metil]-6-[5-(morfolin-4-il)pentil]piridin-3-ol
RMT	transcitoza potaknuta receptorom (od engl. <i>receptor-mediated transcytosis</i>)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>reactive oxygen species</i>)

Sarin	izopropil-metilfosfonofluoridat
SH-SY5Y	adherentne i suspendirane ljudske stanice neuroblastoma
SLC	engl. <i>solute carriers</i>
SŽS	središnji živčani sustav
Tabun	etil-dimetilaminocijanofosfonat
TCA	trikloroctena kiselina
TCh	tiokolin
TEPP	tetraetilpirofosfat
t_{\max}	vrijeme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije spoja u krvi
TMB-4	4-[(hidroksiimin)metil]-1-(3-{4-[(hidroksiimin)metil]piridinio}propil)piridinijeva sol
TNB ⁻	anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline
TPSA	ukupno područje polarne površine prema 2D prikazu molekule (engl. <i>total polar surface area</i>)
V_d	volumen distribucije spoja u tijelu
VX	S-2-diizopropilaminoetil-O-etil-metilfosfonotioat

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. 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. Siwach i L. Smit, Pesticide poisoning in the developing world—a minimum pesticides list, *Lancet* **360** (2002) 1163–1167.
2. M. Eddleston, N. A. Buckley, P. Eyer i A. H. Dawson, Management of acute organophosphorus pesticide poisoning, *Lancet* **371** (2008) 597–607.
3. <https://www.opcw.org/news/article/opcw-director-general-shares-incontrovertible-laboratory-results-concluding-exposure-to-sarin/> (preuzeto 20. lipnja 2018.)
4. <https://www.opcw.org/news/article/opcw-fact-finding-mission-confirms-use-of-chemical-weapons-in-khan-shaykhun-on-4-april-2017/> (preuzeto 20. lipnja 2018.)
5. <https://www.opcw.org/news/article/statement-from-opcw-spokesperson-in-response-to-media-queries-regarding-alleged-use-of-nerve-agent-vx-in-malaysia/> (preuzeto 20. lipnja 2018.)
6. <https://www.independent.co.uk/voices/novichok-nerve-agent-sergei-yulia-skripal-history-a8373791.html> (preuzeto 20. lipnja 2018.)
7. J. H. McDonough i T. M. Shih, Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology, *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21** (1997) 559–579.
8. A. N. Çokuğraş, Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance, *Turkish J. Biochem. -Turk J Biochem.* **28** (2003) 54–61.
9. S. Darvesh, D. A. Hopkins i C. Geula, Neurobiology of butyrylcholinesterase, *Nat. Rev. Neurosci.* **4** (2003) 131–138.
10. F. Nachon, X. Brazzolotto, M. Trovaslet i P. Masson, Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers, *Chem. Biol. Interact.* **206** (2013) 536–544.
11. T. Kadar, S. Shapira, G. Cohen, R. Sahar, D. Alkalay i L. Raveh, Sarin-induced neuropathology in rats, *Hum. Exp. Toxicol.* **14** (1995) 252–259.
12. B. E. McDonald, L. G. Costa i S. D. Murphy, Spatial memory impairment and central muscarinic receptor loss following prolonged treatment with organophosphates, *Toxicol. Lett.* **40** (1988) 47–56.
13. N. Yanagisawa, H. Morita i T. Nakajima, Sarin experiences in Japan: Acute toxicity

- and long-term effects, *J. Neurol. Sci.* **249** (2006) 76–85.
14. E. S. Rocha, S. R. Chebabo, M. D. Santos, Y. Aracava i E. X. Albuquerque, An Analysis of Low Level Doses of Cholinesterase Inhibitors in Cultured Neurons and Hippocampal Slices of Rats, *Drug Chem. Toxicol.* **21** (1998) 191–200.
 15. A. Watson, D. Opresko, R. A. Young, V. Hauschild, J. King i K. Bakshi, Organophosphate nerve agents, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R. C. Gupta (ur.), Elsevier, 2015., str. 87–109.
 16. 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.
 17. 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.
 18. G. Lallement, P. Carpentier, A. Collet, I. Pernot-Marino, D. Baubichon i G. Blanchet, Effects of soman-induced seizures on different extracellular amino acid levels and on glutamate uptake in rat hippocampus, *Brain Res.* **563** (1991) 234–240.
 19. N. M. Bakry, A. H. el-Rashidy, A. T. Eldefrawi i M. E. Eldefrawi, Direct actions of organophosphate anticholinesterases on nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors, *J. Biochem. Toxicol.* **3** (1988) 235–259.
 20. E. S. Rocha, M. D. Santos, S. R. Chebabo, Y. Aracava i E. X. Albuquerque, Low concentrations of the organophosphate VX affect spontaneous and evoked transmitter release from hippocampal neurons: Toxicological relevance of cholinesterase-independent actions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **159** (1999) 31–40.
 21. K. S. Rao, Y. Aracava, D. L. Rickett i E. X. Albuquerque, Noncompetitive blockade of the nicotinic acetylcholine receptor-ion channel complex by an irreversible cholinesterase inhibitor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **240** (1987).
 22. J. D. Stone, A. V. Terry, J. R. Pauly, M. A. Prendergast i J. J. Buccafusco, Protractive effects of chronic treatment with an acutely sub-toxic regimen of diisopropylflurophosphate on the expression of cholinergic receptor densities in rats, *Brain Res.* **882** (2000) 9–18.
 23. J. Kassa, J. Bajgar, K. Kuča i D. Jun, Behavioral toxicity of nerve agents, *Handbook*

- of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R. C. Gupta (ur.), Elsevier, 2015., str. 477–487.
24. T. L. Pazdernik, M. R. Emerson, R. Cross, S. R. Nelson i F. E. Samson, Soman-induced seizures: limbic activity, oxidative stress and neuroprotective proteins, *J. Appl. Toxicol.* **21** (2001) S87–S94.
 25. S. Kaur, S. Singh, K. S. Chahal i A. Prakash, Potential pharmacological strategies for the improved treatment of organophosphate-induced neurotoxicity, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **92** (2014) 893–911.
 26. F. Terrier, P. Rodriguez-Dafonte, E. Le Guével i G. Moutiers, Revisiting the reactivity of oximate α -nucleophiles with electrophilic phosphorus centers. Relevance to detoxification of sarin, soman and DFP under mild conditions, *Org. Biomol. Chem.* **4** (2006) 4352–4363.
 27. A. Falb i W. D. Erdmann, [Penetration of ^{14}C -obidoxime through the so-called blood-brain barrier of mice and rats], *Arch. Toxikol.* **24** (1969) 123–132.
 28. 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.
 29. K. Sakurada, K. Matsubara, K. Shimizu, H. Shiono, Y. Seto, K. Tsuge, M. Yoshino, I. Sakai, H. Mukoyama i T. Takatori, Pralidoxime iodide (2-PAM) penetrates across the blood-brain barrier, *Neurochem. Res.* **28** (2003) 1401–1407.
 30. 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.
 31. H. Kalász, S. M. Nurulain, G. Veress, S. Antus, F. Darvas, E. Adeghate, A. Adem, F. Hashemi i K. Tekes, Mini review on blood-brain barrier penetration of pyridinium aldoximes, *J. Appl. Toxicol.* **35** (2015) 116–123.
 32. M. Jokanović, Pyridinium oximes in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R. C. Gupta (ur.), Elsevier, 2015., str. 1057–1070.
 33. R. Kusić, B. Bosković, V. Vojvodić i D. Jovanović, HI-6 in man: blood levels, urinary excretion, and tolerance after intramuscular administration of the oxime to healthy volunteers, *Fundam. Appl. Toxicol.* **5** (1985) S89–97.
 34. D. H. Moore, I. J. Hayward, F. Steve Tucker i B. Lukey, HI-6 and 2-PAM in sheep:

- Pharmacokinetics and effects on muscle tissue following intramuscular injection, *Biopharm. Drug Dispos.* **12** (1991) 223–232.
35. H. Thiermann, F. Eyer, N. Felgenhauer, R. Pfab, T. Zilker, P. Eyer i F. Worek, Pharmacokinetics of obidoxime in patients poisoned with organophosphorus compounds, *Toxicol. Lett.* **197** (2010) 236–242.
36. A. Veinlichova, P. Jancova, M. Siller, P. Anzenbacher, K. Kuča, D. Jun, J. Fusek i E. Anzenbacherova, Effect of acetylcholinesterase oxime-type reactivators K-48 and HI-6 on human liver microsomal cytochromes P450 *in vitro*, *Chem. Biol. Interact.* **180** (2009) 449–453.
37. F. S. Katz, S. Pecic, T. H. Tran, I. Trakht, L. Schneider, Z. Zhu, L. Ton-That, M. Luzac, V. Zlatanovic, S. Damera, J. Macdonald, D. W. Landry, L. Tong i M. N. Stojanovic, Discovery of new classes of compounds that reactivate acetylcholinesterase inhibited by organophosphates, *ChemBioChem* **16** (2015) 2205–2215.
38. R. K. Sit, Z. Radić, V. Gerardi, L. Zhang, E. Garcia, M. Katalinić, G. Amitai, Z. Kovarik, V. V Fokin, K. B. Sharpless i P. Taylor, New structural scaffolds for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 19422–19430.
39. Z. Radić, R. K. Sit, Z. Kovarik, S. Berend, E. Garcia, L. Zhang, G. Amitai, C. Green, B. Radić, V. V Fokin, K. B. Sharpless i P. Taylor, Refinement of structural leads for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 11798–11809.
40. Z. Radić, R. K. Sit, E. Garcia, L. Zhang, S. Berend, Z. Kovarik, G. Amitai, V. V Fokin, K. Barry Sharpless i P. Taylor, Mechanism of interaction of novel uncharged, centrally active reactivators with OP-hAChE conjugates, *Chem. Biol. Interact.* **203** (2013) 67–71.
41. Z. Kovarik, N. Maček, R. K. Sit, Z. Radić, V. V Fokin, K. Barry Sharpless i P. Taylor, Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated AChE, *Chem. Biol. Interact.* **203** (2013) 77–80.
42. 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 dephosphorylation of poisoned human acetylcholinesterase, *Chem. Commun.* **47** (2011) 5295.
43. G. Mercey, T. Verdelet, J. Renou, M. Kliachyna, R. Baati, F. Nachon, L. Jean i P. Y.

- Renard, Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents, *Acc. Chem. Res.* **45** (2012) 756–766.
44. G. Mercey, J. Renou, T. Verdelet, M. Kliachyna, R. Baati, E. Gillon, M. Arboléas, M. Loiodice, F. Nachon, L. Jean i P. Y. Renard, Phenyltetrahydroisoquinoline–pyridinaldoxime conjugates as efficient uncharged reactivators for the dephosphylation of inhibited human acetylcholinesterase, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 10791–10795.
45. J. Renou, G. Mercey, T. Verdelet, E. Păunescu, E. Gillon, 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.
46. J. Renou, M. Loiodice, M. Arboléas, R. Baati, L. Jean, F. Nachon i P. Y. Renard, Tryptoline-3-hydroxypyridinaldoxime conjugates as efficient reactivators of phosphylated human acetyl and butyrylcholinesterases, *Chem. Commun.* **50** (2014) 3947–3950.
47. J. Kalisiak, E. C. Ralph i J. R. Cashman, Nonquaternary Reactivators for Organophosphate-Inhibited Cholinesterases, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 465–474.
48. H. C. Jeong, N. S. Kang, N. J. Park, E. K. Yum i Y. S. Jung, Reactivation potency of fluorinated pyridinium oximes for acetylcholinesterases inhibited by paraoxon organophosphorus agent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 1214–1217.
49. H. C. Jeong, N. J. Park, C. H. Chae, K. Musilek, J. Kassa, K. Kuča i Y. S. Jung, Fluorinated pyridinium oximes as potential reactivators for acetylcholinesterases inhibited by paraoxon organophosphorus agent, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 6213–6217.
50. J. Kassa, J. Žďárová Karasová, S. Tesarova, K. Musilek, K. Kuča i Y. S. Jung, A comparison of neuroprotective efficacy of the oxime K203 and its fluorinated analogue (KR-22836) with obidoxime in tabun-poisoned rats, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **107** (2010) 861–867.
51. J. E. Chambers, H. W. Chambers, K. E. Funck, E. C. Meek, R. B. Pringle i M. K. Ross, Efficacy of novel phenoxyalkyl pyridinium oximes as brain-penetrating reactivators of cholinesterase inhibited by surrogates of sarin and VX, *Chem. Biol. Interact.* **259** (2016) 154–159.

52. K. Kuča i J. Kassa, A comparison of the ability of a new bispyridinium oxime 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-carbamoylpyridinium)butane dibromide and currently used oximes to reactivate nerve agent-inhibited rat brain acetylcholinesterase by *in vitro* methods, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **18** (2003) 529–535.
53. K. Kuča i Kassa; Jiri, *In vitro* reactivation of acetylcholinesterase using the oxime K027, *Vet. Hum. Toxicol.* **46** (2004) 15–18.
54. K. Kuča i Kassa; Jiri, Oximes-induced reactivation of rat brain acetylcholinesterase inhibited by VX agent, *Hum. Exp. Toxicol.* **23** (2004) 167–171.
55. J. Cabal, K. Kuča i J. Kassa, Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **95** (2004) 81–86.
56. M. Čalić, A. Lucić 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.
57. K. Kuča, K. Musilek, D. Jun, J. Žďárová Karasová, E. Nepovimova, O. Soukup, M. Hrabínova, J. Mikler, T. C. C. Franca, E. F. F. Da Cunha, A. A. De Castro, M. Valis i T. C. Ramalho, A newly developed oxime K203 is the most effective reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase, *BMC Pharmacol. Toxicol.* **19** (2018) 8.
58. Z. Kovarik, A. Lucić Vrdoljak, S. Berend, M. Katalinić, K. Kuča, K. Musilek i B. Radić, evaluation of oxime K203 as antidote in tabun poisoning, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **60** (2009) 19–26.
59. J. Kassa, J. Žďárová Karasová, K. Musilek i K. Kuča, An evaluation of therapeutic and reactivating effects of newly developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice, *Toxicology* **243** (2008) 311–316.
60. J. Bajgar, J. Fusek, J. Kassa, K. Kuča i D. Jun, Global impact of chemical warfare agents used before and after 1945, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R. C. Gupta (ur.), Elsevier, 2015., str. 17–25.
61. Izvještaj „Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture”, Svjetska zdravstvena organizacija, Ženeva, 1990.; <http://apps.who.int/iris/handle/10665/39772> (preuzeto 20. lipnja 2018.)

62. Izvještaj „The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009”, Svjetska zdravstvena organizacija Ženeva, 2009.; http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf (preuzeto 20. lipnja 2018.)
63. http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=active_substance.selectionilanguage=EN, (preuzeto 20. lipnja 2018.)
64. A. Bosak, M. Katalinić i Z. Kovarik, Kolinesteraze: Struktura, uloga, inhibicija, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62** (2011) 175–190.
65. Konvencija „Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction”, Organizacija za zabranu kemijskog oružja, Hag, 2005.; <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/download-convention> (preuzeto 20. lipnja 2018.)
66. N. B. Munro, S. S. Talmage, G. D. Griffin, L. C. Waters, A. P. Watson, J. F. King i V. Hauschild, The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products, *Environ. Health Perspect.* **107** (1999) 933–974.
67. H. John, F. Balszuweit, K. Kehe, W. Franzand i H. Thiermann, Toxicokinetic Aspects of Nerve Agents and Vesicants, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R. C. Gupta (ur.), Elsevier, 2015., str. 817–856.
68. S. E. Czerwinski, J. P. Skvorak, D. M. Maxwell, D. E. Lenz i S. I. Baskin, Effect of octanol:water partition coefficients of organophosphorus compounds on biodistribution and percutaneous toxicity, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **20** (2006) 241–246.
69. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/991#section=Environmental-Fate-Exposure-Summary> (preuzeto 20. lipnja 2018.)
70. H. M. Gomaa i S. D. Faust, Chemical Hydrolysis and Oxidation of Parathion and Paraoxon in Aquatic Environments, *Fate of Organic Pesticides in the Aquatic Environment*, S. D. Faust (ur.), American Chemical Society, 1972., str. 189–209.
71. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/paraoxon#section=NSC-Number> (preuzeto 20. lipnja 2018.)
72. F. Worek, L. Szinicz, P. Eyer i H. Thiermann, Evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning: Development of a kinetic-based dynamic model, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **209** (2005) 193–202.

73. H. P. Benschop i L. P. A. de Jong, Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation and toxicology, *Acc. Chem. Res.* **21** (1988) 368–374.
74. D. M. Maxwell, K. M. Brecht, F. C. T. Chang, I. Koplovitz, T. M. Shih i R. E. Sweeney, Toxicodynamic modeling of highly toxic organophosphorus compounds, *J. Mol. Neurosci.* **30** (2006) 129–132.
75. S. Žunec, B. Radić, K. Kuča, K. Musilek i A. Lucić Vrdoljak, Comparative determination of the efficacy of bispyridinium oximes in paraoxon poisoning, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **66** (2015) 129–134.
76. J. Misík, R. Pavliková i K. Kuča, Percutaneous toxicity and decontamination of soman, VX, and paraoxon in rats using detergents, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **64** (2013).
77. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+311-45-5> (preuzeto 20.lipnja 2018.)
78. D. M. Maxwell, The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **114** (1992) 306–312.
79. D. M. Maxwell i K. M. Brecht, Carboxylesterase: specificity and spontaneous reactivation of an endogenous scavenger for organophosphorus compounds, *J. Appl. Toxicol.* **21** (2001) S103-7.
80. H. Thiermann, F. Worek i K. Kehe, Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning, *Chem. Biol. Interact.* **206** (2013) 435–443.
81. 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.
82. V. A. Voicu, J. Bajgar, A. Medvedovici, F. S. Radulescu i D. S. Miron, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of some oximes and associated therapeutic consequences: A critical review, *J. Appl. Toxicol.* **30** (2010) 719–729.
83. 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.
84. V. Farar, F. Mohr, M. Legrand, B. Lamotte d’Incamps, J. Cendelin, J. Leroy, M. Abitbol, V. Bernard, F. Baud, V. Fournet, P. Houze, J. Klein, B. Plaud, J. Tuma, M. Zimmermann, P. Ascher, A. Hrabovska, J. Myslivecek i E. Krejci, Near-complete adaptation of the PRiMA knockout to the lack of central acetylcholinesterase, *J.*

- Neurochem.* **122** (2012) 1065–1080.
85. V. Farar, A. Hrabovska, E. Krejci i J. Myslivecek, Developmental adaptation of central nervous system to extremely high acetylcholine levels, *PLoS One* **8** (2013) e68265.
86. A. G. Karczmar, Brief Presentation of the Story and Present Status of Studies of the Vertebrate Cholinergic System, *Neuropsychopharmacology* **9** (1993) 181–199.
87. B. J. Everitt i T. W. Robbins, Central cholinergic systems and cognition, *Annu. Rev. Psychol.* **48** (1997) 649–684.
88. P. E. Gold, Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory, *Neurobiol. Learn. Mem.* **80** (2003) 194–210.
89. J. Liu, C. Uchea, L. Wright i C. Pope, Chemical warfare agents and the nervous system, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R. C. Gupta (ur.), Elsevier, 2015., str. 463–475.
90. N. Vanova, J. Pejchal, D. Herman, A. Dlabkova i D. Jun, Oxidative stress in organophosphate poisoning: role of standard antidotal therapy, *J. Appl. Toxicol.* **38** (2018) 1058–1070.
91. 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.
92. C. D. Smith, R. B. Lee, A. V Moran i M. L. Sipos, Repeated low-dose exposures to sarin, soman, or VX affect acoustic startle in guinea pigs, *Neurotoxicol. Teratol.* **54** (2016) 36–45.
93. M. Jokanović, M. Kosanović, D. Brkić i P. Vukomanović, Organophosphate induced delayed polyneuropathy in man: An overview, *Clin. Neurol. Neurosurg.* **113** (2011) 7–10.
94. T. Okumura, K. Taki, K. Suzuki, T. Yoshida, Y. Kuroiwa i T. Satoh, The Tokyo Subway Sarin Attack: Acute and Delayed Health Effects in Survivors, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R. C. Gupta (ur.), Elsevier, 2015., str. 27–35.
95. K. Steenland, B. Jenkins, R. G. Ames, M. O'Malley, D. Chrislip i J. Russo, Chronic neurological sequelae to organophosphate pesticide poisoning, *Am. J. Public Health* **84** (1994) 731–736.
96. 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.
97. J. C. O'Donnell, J. H. McDonough i T. M. Shih, Changes in extracellular striatal acetylcholine and brain seizure activity following acute exposure to nerve agents in freely moving guinea pigs, *Toxicol. Mech. Methods* **20** (2010) 143–152.
98. L. Pezzementi, F. Nachon i A. Chatonnet, Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: an atypical butyrylcholinesterase from the Medaka *Oryzias latipes*, *PLoS One* **6** (2011) e17396.
99. J. Massoulié, A. Anselmet, S. Bon, E. Krejci, C. Legay, N. Morel i S. Simon, Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization, *J. Physiol.* **92** (1998) 183–190.
100. J. Massoulié, N. Perrier, H. Noureddine, D. Liang i S. Bon, Old and new questions about cholinesterases, *Chem. Biol. Interact.* **175** (2008) 30–44.
101. R. M. Blong, E. Bedows i O. Lockridge, Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus, *Biochem. J.* **327** (Pt 3) (1997) 747–757.
102. 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. Eur. J.* **24** (38) 9675-9691.
103. A. L. Perrier, J. Massoulié i E. Krejci, PRiMA: The membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain, *Neuron* **33** (2002) 275–285.
104. K. A. Petrov, E. Girard, A. D. Nikitashina, C. Colasante, V. Bernard, L. Nurullin, J. Leroy, D. Samigullin, O. Colak, E. Nikolsky, B. Plaud i E. Krejci, Schwann cells sense and control acetylcholine spillover at the neuromuscular junction by $\alpha 7$ nicotinic receptors and butyrylcholinesterase, *J. Neurosci.* **34** (2014) 11870–11883.
105. I. Wessler, C. J. Kirkpatrick i K. Racké, Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans, *Pharmacol. Ther.* **77** (1998) 59–79.
106. A. Chatonnet i O. Lockridge, Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase, *Biochem. J.* **260** (1989) 625–634.
107. P. Taylor i Z. Radić, The cholinesterases: From genes to proteins, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34** (1994) 281–320.

108. O. Lockridge i P. Masson, Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk, *Neurotoxicology* **21** (2000) 113–126.
109. J. Hartmann, C. Kiewert, E. G. Duysen, O. Lockridge, N. H. Greig i J. Klein, Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity, *J. Neurochem.* **100** (2007) 1421–1429.
110. J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker i I. Silman, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein, *Science* **253** (1991) 872–879.
111. G. Kryger, M. Harel, K. Giles, L. Toker, B. Velan, A. Lazar, C. Kronman, D. Barak, N. Ariel, A. Shafferman, I. Silman i J. L. Sussman, Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **56** (2000) 1385–1394.
112. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps i F. Nachon, Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 41141–41147.
113. A. Saxena, A. M. G. Redman, X. Jiang, O. Lockridge i B. P. Doctor, Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase, *Chem. Biol. Interact.* **119–120** (1999) 61–69.
114. J. P. Colletier, D. Fournier, H. M. Greenblatt, J. Stojan, J. L. Sussman, G. Zaccai, I. Silman i M. Weik, Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase, *EMBO J.* **25** (2006) 2746–2756.
115. Y. Bourne, P. Taylor, Z. Radić i P. Marchot, Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site, *EMBO J.* **22** (2003) 1–12.
116. J. Stojan, L. Brochier, C. Alies, J. P. Colletier i D. Fournier, Inhibition of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase by high concentrations of substrate, *Eur. J. Biochem.* **271** (2004) 1364–1371.
117. Y. Zhou, S. Wang i Y. Zhang, Catalytic reaction mechanism of acetylcholinesterase determined by Born-Oppenheimer *ab initio* QM/MM molecular dynamics simulations, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 8817–8825.
118. D. R. Haubrich i T. J. Chippendale, Regulation of acetylcholine synthesis in nervous tissue, *Life Sci.* **20** (1977) 1465–1478.

119. D. M. Quinn, Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states, *Chem. Rev.* **87** (1987) 955–979.
120. A. A. Gorfe, B. Lu, Z. Yu i J. A. McCammon, Enzymatic activity versus structural dynamics: the case of acetylcholinesterase tetramer, *Biophys. J.* **97** (2009) 897–905.
121. W. N. Aldrige i A. N. Davison, The mechanism of inhibition of cholinesterases by organophosphorus compounds, *Biochem. J.* **55** (1953) 763–766.
122. F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz i P. Eyer, Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes, *Biochem. Pharmacol.* **68** (2004) 2237–2248.
123. A. Shafferman, A. Ordentlich, D. Barak, D. Stein, N. Ariel i B. Velan, Aging of phosphorylated human acetylcholinesterase: catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre, *Biochem. J.* **318 (Pt 3)** (1996) 833–840.
124. 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.
125. F. Worek, M. Koller, H. Thiermann i L. Szinicz, Diagnostic aspects of organophosphate poisoning, *Toxicology* **214** (2005) 182–189.
126. L. Wong, Z. Radić, R. J. M. Brüggemann, N. Hosea, H. A. Berman i P. Taylor, Mechanism of oxime reactivation of acetylcholinesterase analyzed by chirality and mutagenesis, *Biochemistry* **39 (19)** (2000) 5750–5757.
127. M. Jokanović, M. Maksimović, V. Kilibarda, D. Jovanović i D. Savić, Oxime-induced reactivation of acetylcholinesterase inhibited by phosphoramidates, *Toxicol. Lett.* **85** (1996) 35–39.
128. 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.
129. F. Ekström, C. Akfur, A. K. Tunemalm i S. Lundberg, Structural changes of phenylalanine 338 and histidine 447 revealed by the crystal structures of tabun-inhibited murine acetylcholinesterase, *Biochemistry* **45** (2006) 74–81.
130. I. B. Wilson, Acetylcholinesterase. XI. Reversibility of tetraethyl pyrophosphate, *J.*

- Biol. Chem.* **190** (1951) 111–117.
131. D. R. Davies i A. L. Green, The chemotherapy of poisoning by organophosphate anticholinesterases, *Br. J. Ind. Med.* **16** (1959) 128–134.
132. K. Musilek, J. Korabecny, D. Jun, J. Kassa i K. Kuča, Novel Cholinesterase Reactivators, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R. C. Gupta (ur.), Elsevier, 2015., str. 1071–1087.
133. D. F. V. Lewis, M. N. Jacobs i M. Dickins, Compound lipophilicity for substrate binding to human P450s in drug metabolism, *Drug Discov. Today* **9** (2004) 530–537.
134. J. Kassa i J. Cabal, A comparison of the efficacy of acetylcholinesterase reactivators against cyclohexyl methylphosphonofluoridate (GF agent) by *in vitro* and *in vivo* methods, *Pharmacol. Toxicol.* **84** (1999) 41–45.
135. 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.
136. J. G. Clement, Toxicology and Pharmacology of Bispyridinium Oximes - Insight into the Mechanism of Action vs Soman Poisoning *in vivo*, *Toxicol. Sci.* **1** (1981) 193–202.
137. M. Jokanović, Pyridinium oximes in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R. C. Gupta (ur.), Elsevier, 2015., str. 1057–1070.
138. D. Jun, L. Musilova, K. Musilek i K. Kuča, *In vitro* ability of currently available oximes to reactivate organophosphate pesticide-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Int. J. Mol. Sci.* **12** (2011) 2077–2087.
139. K. Kuča, D. Jun i K. Musilek, Structural Requirements of acetylcholinesterase reactivators, *Mini-Reviews Med. Chem.* **6** (2006) 269–277.
140. 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.
141. H. Firemark, C. F. Barlow i L. J. Roth, The penetration of 2-PAM-C into brain and the effect of cholinesterase inhibitors on its transport, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **145** (1964).
142. G. A. Petroianu, D. E. Lorke, M. Y. Hasan, A. Adem, R. Sheen, S. M. Nurulain i H.

- Kalasz, Paraoxon has only a minimal effect on pralidoxime brain concentration in rats, *J. Appl. Toxicol.* **27** (2007) 350–357.
143. D. E. Lorke, M. Y. Hasan, S. M. Nurulain, R. Sheen, K. Kuča i G. A. Petroianu, Entry of two new asymmetric bispyridinium oximes (K-27 and K-48) into the rat brain: comparison with obidoxime, *J. Appl. Toxicol.* **27** (2007) 482–490.
144. T. M. Shih, J. A. Guarisco, T. M. Myers, R. K. Kan i J. H. McDonough, The oxime pro-2-PAM provides minimal protection against the CNS effects of the nerve agents sarin, cyclosarin, and VX in guinea pigs, *Toxicol. Mech. Methods* **21** (2011) 53–62.
145. N. J. Abbott, A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof i D. J. Begley, Structure and function of the blood–brain barrier, *Neurobiol. Dis.* **37** (2010) 13–25.
146. D. J. Begley, Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities, *Pharmacol. Ther.* **104** (2004) 29–45.
147. A. M. Palmer i M. S. Alavijeh, Overview of experimental models of the blood-brain barrier in CNS drug discovery, *Curr. Protoc. Pharmacol.* **62** (2013) 7.15.1-7.15.30.
148. <https://neupsykey.com/the-blood-brain-barrier-choroid-plexus-and-cerebrospinal-fluid/> (preuzeto 25. rujna 2018.)
149. M. Laksitorini, V. D. Prasasty, P. K. Kiptoo i T. J. Siahaan, Pathways and progress in improving drug delivery through the intestinal mucosa and blood–brain barriers, *Ther. Deliv.* **5** (2014) 1143–1163.
150. N. J. Abbott, Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery, *J. Inherit. Metab. Dis.* **36** (2013) 437–449.
151. N. J. Abbott, A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof i D. J. Begley, Structure and function of the blood-brain barrier, *Neurobiol. Dis.* **37** (2010) 13–25.
152. P. Carpentier, I. S. Delamanche, M. Le Bert, G. Blanchet i C. Bouchaud, Seizure-related opening of the blood-brain barrier induced by soman: possible correlation with the acute neuropathology observed in poisoned rats, *Neurotoxicology* **11** (1990) 493–508.
153. H. Pajouhesh i G. R. Lenz, Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs, *J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **2** (2005) 541–553.
154. M. Laksitorini, V. D. Prasasty, P. K. Kiptoo, i T. J. Siahaan, Pathways and progress in improving drug delivery through the intestinal mucosa and blood-brain-barriers **5** (2015) 1143–1163.

155. T. M. Shih, J. W. Skovira, J. C. O'Donnell i J. H. McDonough, Treatment with tertiary oximes prevents seizures and improves survival following sarin intoxication, *J. Mol. Neurosci.* **40** (2010) 63–69.
156. J. W. Skovira, J. C. O'Donnell, I. Koplovitz, R. K. Kan, J. H. McDonough i T. M. Shih, Reactivation of brain acetylcholinesterase by monoisonitrosoacetone increases the therapeutic efficacy against nerve agents in guinea pigs, *Chem. Biol. Interact.* **187** (2010) 318–324.
157. J. C. DeMar, E. D. Clarkson, R. H. Ratcliffe, A. J. Campbell, S. G. Thangavelu, C. A. Herdman, H. Leader, S. M. Schulz, E. Marek, M. A. Medynets, T. C. Ku, S. A. Evans, F. A. Khan, R. R. Owens, M. P. Nambiar i R. K. Gordon, Pro-2-PAM therapy for central and peripheral cholinesterases, *Chem. Biol. Interact.* **187** (2010) 191–198.
158. 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.
159. J. B. Bhonsle, R. Causey, B. L. Oyler, C. Bartolucci, D. Lamba, A. Pesaresi, N. K. Bhamare, I. Soojhawon, G. E. Garcia, Evaluation and computational characterization of the facilitated transport of Glc carbon C-1 oxime reactivators across a blood brain barrier model, *Chem. Biol. Interact.* **203** (2013) 129-134,161.
160. S. Wagner, J. Kufleitner, A. Zensi, M. Dadparvar, S. Wien, J. Bungert, T. Vogel, F. Worek, J. Kreuter i H. von Briesen, Nanoparticulate transport of oximes over an *in vitro* blood-brain barrier model, *PLoS One* **5** (2010) e14213.
161. Y. J. Rosenberg, L. Mao, X. Jiang, J. Lees, L. Zhang, Z. Radić i P. Taylor, Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reverses early and advanced symptoms in macaques exposed to sarin vapor, *Chem. Biol. Interact.* **274** (2017) 50–57.
162. 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.
163. K. J. Okolotowicz, M. Dwyer, E. Smith i J. R. Cashman, Preclinical studies of noncharged oxime reactivators for organophosphate exposure, *J Biochem. Mol. Toxicol.* **28** (2014) 246–255.

164. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres i R. M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88–95.
165. P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Šinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf i E. Reiner, Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment, *Anal. Biochem.* **312** (2003) 224–227.
166. A. Kumar i T. Darreh-Shori, DMSO: A mixed-competitive inhibitor of human acetylcholinesterase, *ACS Chem. Neurosci.* **8** (2017) 2618–2625.
167. 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.
168. K. Valko, C. Du, C. Bevan, D. Reynolds i M. Abraham, Rapid method for the estimation of octanol/water partition coefficient ($\text{Log } P_{\text{oct}}$) from gradient RP-HPLC retention and a hydrogen bond acidity term ($\text{Sigma } \alpha_2\text{H}$), *Curr. Med. Chem.* **8** (2001) 1137–1146.
169. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* **65** (1983) 55–63.
170. <http://www.abcam.com/dcfda-h2dcfda-cellular-reactive-oxygen-species-detection-assay-kit-ab113851.html> (preuzeto 20. lipnja 2018.)
171. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals, American Veterinary Medical Association, 2013., <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf> (preuzeto 20. lipnja 2018.)
172. A. E. Gillam, *Introduction to electronic absorption spectroscopy in organic chemistry*, (ur. E. S. Stern, C. J. Timmons), Edward Arnold, London, 1970, str. 149.
173. T. Zorbaz, D. Malinak, N. Maraković, N. Maček Hrvat, A. Zandona, M. Novotny, A. Skarka, R. Andrys, O. Benkova, Marketa Soukup, M. Katalinić, K. Kuča, 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.* (2018) prihvaćeno.
174. M. Katalinić, G. Šinko, N. Maček Hrvat, T. Zorbaz, A. Bosak i Z. Kovarik, Oxime-assisted reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase analysed by active site

- mutations, *Toxicology* **406–407** (2018) 104–113.
175. N. Maček Hrvat, S. Žunec, P. Taylor, Z. Radić i Z. Kovarik, HI-6 assisted catalytic scavenging of VX by acetylcholinesterase choline binding site mutants, *Chem. Biol. Interact.* **259** (2016) 148–153.
176. 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.
177. A. Lucić Vrdoljak, M. Calić, B. Radić, S. Berend, D. Jun, K. Kuča i Z. Kovarik, Pretreatment with pyridinium oximes improves antidotal therapy against tabun poisoning, *Toxicology* **228** (2006) 41–50.
178. E. H. Rydberg, B. Brumshtein, H. M. Greenblatt, D. M. Wong, D. Shaya, L. D. Williams, P. R. Carlier, Y. P. Pang, I. Silman i J. L. Sussman, Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 5491–5500.
179. M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P. H. Axelsen, I. Silman i J. L. Sussman, Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90** (1993) 9031–9035.
180. A. da S. Gonçalves, T. C. C. França, J. D. Figueroa-Villar i P. G. Pascutti, Molecular dynamics simulations and QM/MM studies of the reactivation by 2-PAM of tabun inhibited human acetylcholinesterase, *J. Braz. Chem. Soc.* **22** (2011) 155–165.
181. Y. Li, L. Du, Y. Hu, X. Sun i J. Hu, Theoretical study on the aging and reactivation mechanism of tabun-inhibited acetylcholinesterase by using the quantum mechanical/molecular mechanical method, *Can. J. Chem.* **90** (2012) 376–383.
182. T. Driant, F. Nachon, C. Ollivier, P. Y. Renard i E. Derat, On the influence of the protonation states of active site residues on AChE reactivation: A QM/MM approach, *ChemBioChem* **18** (2017) 666–675.
183. F. Ekström, A. Hörnberg, E. Artursson, L. G. Hammarström, G. Schneider i Y. P. Pang, Structure of HI-6•Sarin-Acetylcholinesterase Determined by X-Ray Crystallography and Molecular Dynamics Simulation: Reactivator Mechanism and Design, *PLoS One* **4** (2009) e5957.

184. F. Nachon, E. Carletti, C. Ronco, M. Trovaslet, Y. Nicolet, L. Jean i P. Y. Renard, Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyrylcholinesterase, *Biochem. J.* **453** (2013) 393–399.
185. G. G. Hammes, S. J. Benkovic i S. Hammes-Schiffer, Flexibility, diversity, and cooperativity: Pillars of enzyme catalysis, *Biochemistry* **50** (2011) 10422–10430.
186. G. Šinko, M. Čalić i Z. Kovarik, *para*- and *ortho*-pyridinium aldoximes in reaction with acetylthiocholine, *FEBS Lett.* **580** (2006) 3167–3172.
187. G. Horn, T. Wille, K. Musilek, K. Kuča, H. Thiermann i F. Worek, Reactivation kinetics of 31 structurally different bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human butyrylcholinesterase, *Arch. Toxicol.* **89** (2015) 405–414.
188. C. Luo, A. Saxena, M. Smith, G. Garcia, Z. Radić, P. Taylor i B. P. Doctor, Phosphoryl oxime inhibition of acetylcholinesterase during oxime reactivation is prevented by edrophonium, *Biochemistry* **38** (1999) 9937–9947.
189. Y. Bourne, H. C. Kolb, Z. Radić, K. B. Sharpless, P. Taylor i P. Marchot, Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 1449–1454.
190. Y. Wang, Y. Wei, S. Oguntayo, B. P. Doctor i M. P. Nambiar, A combination of [+] and [-]-Huperzine A improves protection against soman toxicity compared to [+] Huperzine A in guinea pigs, *Chem. Biol. Interact.* **203** (2013) 120–124.
191. Y. Ashani, A. K. Bhattacharjee, H. Leader, A. Saxena i B. P. Doctor, Inhibition of cholinesterases with cationic phosphonyl oximes highlights distinctive properties of the charged pyridine groups of quaternary oxime reactivators, *Biochem. Pharmacol.* **66** (2003) 191–202.
192. G. Saint-André, M. Kliachyna, S. Kodepelly, L. Louise-Leriche, E. Gillon, P. Y. Renard, F. Nachon, R. Baati i A. Wagner, Design, synthesis and evaluation of new α -nucleophiles for the hydrolysis of organophosphorus nerve agents: application to the reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase, *Tetrahedron* **67** (2011) 6352–6361.
193. J. Ždárová Karasová, F. Zemek, J. Kassa i K. Kuča, Entry of oxime K027 into the different parts of rat brain: Comparison with obidoxime and oxime HI-6, *J. Appl. Biomed.* **12** (2014) 25–29.

194. Z. Kovarik, M. Čalić, G. Šinko, A. Bosak, S. Berend, A. Lucić Vrdoljak i B. Radić, Oximes: Reactivators of phosphorylated acetylcholinesterase and antidotes in therapy against tabun poisoning, *Chem. Biol. Interact.* **175** (2008) 173–179.
195. Z. Kovarik, M. Čalić, G. Šinko i A. Bosak, Structure-activity approach in the Reactivation of tabun-phosphorylated human acetylcholinesterase with bispyridinium para-aldoximes, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **58** (2007) 201–209.
196. Z. Kovarik, Z. Radić, H. A. Berman, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner i P. Taylor, Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphonylated conjugates, *Biochemistry* **43** (2004) 3222–3229.
197. 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.
198. M. Lobell, L. Molnár i G. M. Keserü, Recent advances in the prediction of blood–brain partitioning from molecular structure, *J. Pharm. Sci.* **92** (2003) 360–370.
199. T. T. Wager, R. Y. Chandrasekaran, X. Hou, M. D. Troutman, P. R. Verhoest, A. Villalobos i Y. Will, Defining desirable central nervous system drug space through the alignment of molecular properties, *in vitro* ADME, and safety attributes, *ACS Chem. Neurosci.* **1** (2010) 420–434.
200. T. T. Wager, X. Hou, P. R. Verhoest i A. Villalobos, Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties, *ACS Chem. Neurosci.* **1** (2010) 435–449.
201. T. T. Wager, X. Hou, P. R. Verhoest i A. Villalobos, Central nervous system multiparameter optimization desirability: Application in drug discovery, *ACS Chem. Neurosci.* **7** (2016) 767–775.
202. B. J. Bennion, N. A. Be, M. W. McNerney, V. Lao, E. M. Carlson, C. A. Valdez, M. A. Malfatti, H. A. Enright, T. H. Nguyen, F. C. Lightstone i T. S. Carpenter, Predicting a drug's membrane permeability: A computational model validated with *in vitro* permeability assay data, *J. Phys. Chem. B* **121** (2017) 5228–5237.
203. F. Zemek, J. Ždárová Karasová, V. Sepsova i K. Kuča, Acetylcholinesterase reactivators (HI-6, obidoxime, trimedoxime, K027, K075, K127, K203, K282): Structural evaluation of human serum albumin binding and absorption kinetics, *Int. J.*

- Mol. Sci.* **14** (2013) 16076–16086.
204. H. Thiermann, L. Szinicz, F. Eyer, F. Worek, P. Eyer, N. Felgenhauer i T. Zilker, Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning, *Toxicol. Lett.* **107** (1999) 233–239.
205. M. L. Amin, P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery, *Drug Target Insights* **7** (2013) 27–34.
206. T. N. Pashirova, A. Braïki, I. V. Zueva, K. A. Petrov, V. M. Babaev, E. A. Burilova, D. A. Samarkina, I. K. Rizvanov, E. B. Souto, L. Jean, P. Y. Renard, P. Masson, L. Y. Zakharova & O. G. Sinyashin, Combination delivery of two oxime-loaded lipid nanoparticles: Time-dependent additive action for prolonged rat brain protection, *J. Control. Release* **290** (2018) 102–111.
207. F. Worek, N. Aurbek, T. Wille, P. Eyer i H. Thiermann, Kinetic prerequisites of oximes as effective reactivators of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase: A theoretical approach, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **26** (2011) 303–308

§ 9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Prezime / ime	Zorbaz / Tamara
Adresa	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Ksaverska cesta 2, p.p. 291, HR-10001 Zagreb, Hrvatska
Telefon/ Fax/ E-mail	+385 1 4682 556 / +385 1 4673 303 / tzorbaz@imi.hr
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum / mjesto rođenja	02. 07. 1990., Zagreb, Hrvatska

RADNO ISKUSTVO

Datum (od - do)	2015. →
Ustanova zaposlenja	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Odjel	Jedinica za biokemiju i organsku analitičku kemiju
Radno mjesto	doktorand - stručni suradnik u sustavu znanosti i visokom obrazovanju (2.1.2015. →2.1.2017.); asistent (2.1.2017. →)
Područje istraživanja	Interakcije kolinesteraza s antidotima i inhibitorima; reaktivacija kolinesteraza inhibiranih organofosforinim spojevima; ispitivanje i procjena svojstava bitnih za farmakološku učinkovitost antidota

ŠKOLOVANJE

Datum	2015. →
Ustanova	Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Studij	Poslijediplomski doktorski studij kemije, smjer biokemija
Datum	2009. – 2014.
Ustanova	Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Studij	Medicinska biokemija
Naslov diplomskog rada	“Učinak inhibitora Hsp90, 17-DMAG-a, na ekspresiju galektina-3”
Zvanje	magistra medicinske biokemije

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinji jezik	Hrvatski
Drugi jezici	Engleski (B2), Francuski (B1.1), Njemački (A1), Španjolski (A1)
Tehničke kompeticije	MS Office, GraphPad Prism, ChemBioDraw, Discovery Studio, ChemAxon's Marvin
Ostalo	Članstvo: Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju

PUBLIKACIJE

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima (6)
Kongresno priopćenje (sažeci) u CC (4) i ostalim (4) časopisima
Sažeci u zbornicima skupova (11)

POPIS PUBLIKACIJA

1. **Zorbaz, Tamara**; Malinak, David; Maraković, Nikola; Maček Hrvat, Nikolina; Zandona, Antonio; Novotny, Michal; Skarka, Adam; Andrys, Rudolf; Benkova, Marketa; Soukup, Ondrej; Katalinić, Maja; Kuča, Kamil; Kovarik, Zrinka; Musilek, Kamil. Pyridinium oximes with *ortho*-positioned chlorine moiety exhibit improved physicochemical properties and efficient reactivation of human acetylcholinesterase inhibited by several nerve agents; *Journal of Medicinal Chemistry*. (2018) prihvaćen (članak, znanstveni).
2. Katalinić, Maja; Šinko, Goran; Maček Hrvat, Nikolina; **Zorbaz, Tamara**; Bosak, Anita; Kovarik, Zrinka. Oxime-assisted reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase analysed by active site mutations. *Toxicology*. **406-407** (2018); 104-113 (članak, znanstveni).
3. **Zorbaz, Tamara**; Braiki, Anissa; Maraković, Nikola; Renou, Julien; de la Mora, Eugenio; Maček Hrvat, Nikolina; Katalinić, Maja; Silman, Israel; Sussman, Joel L; Mercey, Guillaume; Gomez, Catherine; Mougeot, Romain; Perez, Belen; Baati, Rachid; Nachon, Florian; Weik, Martin; Jean, Ludovic; Kovarik, Zrinka; Renard, Pierre-Yves. Potent 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime reactivators of organophosphate-inhibited cholinesterases with predicted blood-brain barrier penetration. *Chemistry – a European Journal*. **24** (2018); 9675-9691 (članak, znanstveni).
4. d'Incamps, Boris Lamotte; **Zorbaz, Tamara**; Dingova, Dominika; Krejci, Eric; Ascher, Philippe. Stoichiometry of the heteromeric nicotinic receptors of the Renshaw cell. *The Journal of Neuroscience*. **38** (2018), 21; 4943-4956 (članak, znanstveni).
5. Maček Hrvat, Nikolina; **Zorbaz, Tamara**; Šinko, Goran; Kovarik, Zrinka. The estimation of oxime efficiency is affected by the experimental design of phosphylated acetylcholinesterase reactivation. *Toxicology Letters*. **293** (2018); 222-228. (članak, znanstveni).
6. 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 (članak, znanstveni).

NAGRADE I STIPENDIJE

1. Znanstvena stipendija Vlade Republike Francuske 2016. za dvomjesečno stručno usavršavanje: COGNAC G (*Cognition and Action Group*), *Le Centre national de la recherche scientifique* CNRS MD, UMR 8257, *Université Paris Descartes*, Pariz, Francuska; voditelj: dr. sc. Eric Krejci.
2. Nagrada za poster *ISN/IBRO-PERC Young Investigator Poster Prize* na *XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms*, Marseille, Francuska, 2016.
3. Nagrada za poster na *16th Medical Chemical Defense Conference*, München, Njemačka, 2017.
4. Stipendija za sudjelovanje na *17th FEBS Young Scientists' Forum* i *42nd FEBS Congress*, Jeruzalem, Izrael, 2017.
5. Stipendija za sudjelovanje na *13th International Meeting on Cholinesterases and the 7th International Conference on Paraoxonases*, Hradec Králové, Češka Republika, 2018.
6. Nagrada za poster na *13th International Meeting on Cholinesterases and the 7th International Conference on Paraoxonases*, Hradec Králové, Češka Republika, 2018.