

# Farmakokinetika i farmakodinamika učinkovitog reaktivatora acetilkolinesteraze

---

**Pavošević, Kristian**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:129908>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Kristian Pavošević**

**Farmakokinetika i farmakodinamika**  
**učinkovitog reaktivatora acetilkolinesteraze**

**Zagreb, 2021.**

Ovaj rad izrađen je u Jedinici za biokemiju i organsku analitičku kemiju, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, pod mentorstvom dr. sc. Zrinke Kovarik i prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja mag. biol. exp.

## **Zahvala:**

Velika hvala svojoj mentorici dr. sc. Zrinki Kovarik na predloženoj temi i omogućavanju izvođenje željenog rada na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada. Posebno zahvaljujem dr. sc. Tamari Zorbaz na stručnoj i svesrdnoj pomoći tijekom izrade i pisanja rada.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

## FARMAKOKINETIKA I FARMAKODINAMIKA UČINKOVITOG REAKTIVATORA ACETILKOLINESTERAZE

Kristian Pavošević

Rooseveltov trg, 10000 Zagreb, Hrvatska

Acetilkolinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7) je enzim intenzivno istraživan u području biokemije i toksikologije zbog svoje iznimne važnosti u homeostazi organizma. Fiziološki supstrat AChE je acetilkolin (ACh), živčani prijenosnik u središnjem (SŽS) i perifernom (PŽS) živčanom sustavu. Izloženost organofosforim (OP) spojevima uzrokuje akutnu toksičnost koja je rezultat inhibicije aktivnosti AChE uslijed čega je zaustavljena kataliza hidrolize i razgrađivanje ACh prilikom čega dolazi do poremećaja prijenosa živčanih impulsa unutar kolinergičnih sinapsi SŽS-a i PŽS-a. Kao terapija uslijed trovanja OP spojevima koriste se oksimski reaktivatori inhibirane AChE (pr. 2-PAM, HI-6, obidoksim, TMB-4), ali njihova je učinkovitost ograničena zbog visoke specifičnosti konjugata kojeg stvaraju enzim i OP spoj te zbog slabog prolaska i djelovanja u mozgu. Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi farmakološke karakteristike novosintetiziranog hidroksipiridinskog reaktivatora AChE, JR595, dizajniranog za prolazak u SŽS. *In silico* metode korištene su za predikciju parametara koji opisuju farmakokinetički profil oksima, a *in vitro* kinetičke metode za određivanje njegove farmakodinamike na modelu mišje i ljudske AChE pri sobnoj i fiziološkoj temperaturi. Konačno, dobiveni rezultati uspoređeni su s objavljenim *in vivo* učincima JR595 oksima kao antidota za trovanje OP spojevima kako bi se utvrdile strukturne i farmakološke prednosti ili nedostaci ispitivanog reaktivatora.

(56 stranica, 14 slika, 13 tablica, 8 jednadžbi, 1 shema, 89 literaturnih navoda, izvorni jezik: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: enzim, supstrat, organofosfori spoj, oksim, neurotoksičnost, antidot

Voditelj: dr. sc. Zrinka Kovarik, znan. savj. tr. zv.

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Nada Oršolić

prof. dr. sc. Sven Jelaska

izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 11. siječnja 2021.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Graduation Thesis

Faculty of Science

Department of Biology

## PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF AN EFFICIENT ACETYLCHOLINESTERASE REACTIVATOR

Kristian Pavošević

Rooseveltova trg, 10000 Zagreb, Croatia

Acetylcholinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) is an intensively investigated enzyme in fields of biochemistry and toxicology. Acetylcholine (ACh), a substrate molecule for AChE, acts as a neurotransmitter in central (CNS) and peripheral (PNS) nervous system. Exposure to organophosphorus (OP) compounds induces an acute toxicity due to AChE inhibition that stops the catalysis of ACh hydrolysis and degradation and impairs nerve signal transduction in cholinergic synapses of CNS and PNS. Available therapy for OP intoxication includes oxime antidotes with potential to reactivate inhibited AChE (e.g., 2-PAM, HI-6, obidoxime), but their efficiency is limited due to the high specificity of enzyme-OP conjugate and poor penetration and effect in the brain. The aim of this thesis was to evaluate pharmacological characteristics of the newly-synthesized hydroxypyridine AChE reactivator, JR595, designed to pass through the BBB (engl. blood-brain barrier) and affect the CNS. Used methods include *in silico* predictions of the parameters that describe pharmacokinetic profile of the oxime and *in vitro* kinetic methods for description of pharmacodynamics on human and mouse AChE model at room and physiological temperature. Finally, obtained results were compared to published *in vivo* effects of JR595 for OP intoxication in order to determine structural and pharmacological advantages or disadvantages of JR595.

(56 pages, 14 figures, 13 tables, 8 equations, 1 scheme, 89 references, original in Croatian)  
Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: enzyme, substrate, organophosphorus compound, oxime, neurotoxicity, antidote

Supervisor: Dr Zrinka Kovarik, Permanent Scientific Advisor

Reviewers: Prof Nada Oršolić

Prof Sven Jelaska

Assoc Prof Martina Šeruga Musić

Thesis accepted: 11 January 2021

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| <b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....   | 4  |
| 2.1. Kolinesteraze .....  | 4  |
| 2.1.1. Općenito o kolinesterazama .....   | 4  |
| 2.1.2. Struktura kolinesteraza .....  | 4  |
| 2.2. Organofosforni spojevi .....   | 7  |
| 2.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva i važnost OP spojeva .....                             | 7  |
| 2.2.2. Živčani bojni otrovi .....   | 8  |
| 2.2.3. Mehanizam toksičnosti OP spojeva.....  | 9  |
| 2.2.4. Terapija i antidoti za živčane bojne otrove.....                                   | 10 |
| 2.3. Farmakologija oksimskih reaktivatora acetilkolinesteraze.....                        | 12 |
| 2.3.1. Farmakodinamika i farmakokinetika oksimskih antidota .....                         | 13 |
| 2.3.2. Farmakološki profil standardnih oksima i njihovi nedostaci.....                    | 14 |
| 2.4. Dizajn reaktivatora s djelovanjem na središnji živčani sustav .....                  | 16 |
| 2.4.1. Središnji živčani sustav .....   | 16 |
| 2.4.2. Krvno-moždana barijera.....  | 17 |
| 2.4.3. Pristupi u dizajnu oksimskih reaktivatora s djelovanjem na SŽS .....               | 18 |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....   | 20 |
| 3.1. Kemikalije i enzimski preparati.....   | 20 |
| 3.2. <i>In silico</i> određivanje fizikalno-kemijskih i farmakokinetičkih parametara..... | 22 |
| 3.3. Mjerenje kinetičke aktivnosti enzima.....  | 24 |
| 3.3.1. Mjerenje reverzibilne inhibicije .....   | 26 |
| 3.3.2. Reaktivacija fosforiliranih kolinesteraza korištenjem oksima.....                  | 26 |
| 3.4. Korištene jednadžbe i obrada podataka .....  | 27 |
| 3.4.1. Katalitičke konstante .....  | 27 |
| 3.4.2. Konstante reverzibilne inhibicije.....   | 27 |
| 3.4.3. Konstante reaktivacije .....   | 28 |
| <b>4. REZULTATI</b> .....   | 30 |
| 4.1. <i>In silico</i> procjena farmakokinetike JR595 oksima .....                         | 30 |
| 4.2. Procjena farmakodinamičkog profila oksima <i>in vitro</i> kinetičkim metodama .....  | 35 |
| 4.2.1. Usporedba aktivnosti ljudske (hAChE) i mišje (mAChE) acetilkolinesteraze.....      | 35 |
| 4.2.2. Reverzibilna inhibicija hAChE i mAChE sa standarnim i neutralnim oksimima .....    | 37 |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2.3. Reaktivacija mAChE inhibirane sarinom i VX-om pomoću JR595..... | 41        |
| 4.2.4. Utjecaj temperature na reaktivacijski potencijal JR595 .....    | 43        |
| <b>5. DISKUSIJA.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>6. ZAKLJUČAK.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>7. LITERATURNI IZVORI.....</b>                                      | <b>50</b> |



# KRATICE

---

- 2-PAM, 2-[(hidroksiimino)metil]-1-metilpiridinijeva sol
- ACh, acetilkolin
- AChE, acetilkolinesteraza
- ATCh, acetiltiokolin
- AMT, transcitoza potaknuta apsorpcijom
- BChE, butirilkolinesteraza
- DAM, 3-(hidroksiimino)butan-2-on
- DMS, dimetilsulfid
- DTNB, 5,5'-ditiobis-2- nitrobenzojeva kiselina
- hAChE, ljudska acetilkolinesteraza
- HBA, broj akceptora vodikovih veza u molekuli
- HBD, broj donora vodikovih veza u molekuli
- HI-6, 4'-Karbamoil-2-formil-1,1'-(oksdimetilen)di-piridinij-diklorid-2-oksim
- KMB, krvno-moždana barijera
- logD, logaritam koeficijenta razdjeljenja između oktanola i vode pri pH 7.4 ovisno o ionizacijskom stanju molekule
- logSw, logaritam molarne topivosti
- mAChE, mišja acetilkolinesteraza
- mAChR, muskarinski acetilkolinski receptori
- MES, moždane epitelne stanice
- MINA, 1-(hidroksiimino)propan-2-on
- nAChR, nikotinski acetilkolinski receptori
- PES, periferne epitelne stanice
- PPB, vezanje za proteine plazme
- RB, broj rotirajućih veza
- TEPP, tetraetilpirofosfat
- TMB-4, 4- Hidroksiiminometil-(3-4(hidroksiiminometil-1-piridinio)propil) piridinijev dibromid

# 1. UVOD

---

Acetilkolinesteraza (AChE; EC 3.1.1.7) predstavlja primarnu kolinesterazu u ljudskom organizmu te zbog svoje velike katalitičke moći pripada skupini najučinkovitijih enzima u prirodi (Taylor i sur. 2009). Katalizom reakcije hidrolize AChE uklanja neurotransmiter acetilkolin (ACh) iz sinaptičke pukotine i time regulira prijenos živčanog impulsa u središnjem (SŽS) i perifernom živčanom sustavu (PŽS) (Stryer 1991; Taylor i Radić 1994). Živčani bojni otrovi (soman, sarin, tabun, ciklosarin, VX) strukturno su organofosforni (OP) spojevi koji su toksični za organizam i ponašaju se kao ireverzibilni inhibitori AChE (Gupta 2005). Osim kao oružje u terorističkim napadima i ratovima, OP spojevi se koriste i kao pesticidi u okolišu (Cannard 2006). Mehanizam toksičnog djelovanja OP spojeva je kovalentno vezanje fosfora za serin aktivnog mjesta AChE uslijed kojeg je enzim ireverzibilno inhibiran te kao rezultat inhibirana je hidroliza ACh. Inhibicija AChE uzrokuje nakupljanje ACh u sinaptičkoj pukotini te prekomjernu stimulaciju nikotinskih (nAChR) i muskarinskih (mAChR) acetilkolinskih receptora (McDonough i Shih 1997). Trovanje OP spojevima uzrokuje široki spektar zdravstvenih problema, uključujući oštećenje živčanog, imunološkog, endokrinog i reproduktivnog sustava (Gupta 2005). Također, dugoročna izloženost OP spojevima uzrokovala je neuropatološke promjene određenih moždanih regija te neurološke poremećaje poput ataksije, disartrije, fascikulacije i kome (Gupta 2005).

Najbrža klinička dijagnoza kolinergične krize nastale kao posljedica trovanja živčanim bojnim otrovima temelji se na mjerenju aktivnosti kolinesteraza u krvi (Worek i sur.2005). Terapija trovanja OP spojevima dijeli se na profilaktične lijekove (pr. piridostigmin) i lijekove različitih mehanizama koji se koriste nakon trovanja: antagonist mAChR (pr. atropin) koji ublažava muskarinske simptome te po potrebi antikonvulziv (pr. diazepam). Međutim, oksimske molekule (pr. 2-PAM, HI-6, obidoksim, TMB-4) predstavljaju lijek sa mogućnosti reaktivacije AChE inhibirane OP spojem (Bajgar i sur. 2007).

Oksimi djeluju kao reaktivatori zbog svoje anionsko oksimske skupine koja im omogućava da nukleofilnim napadom na enzim-OP konjugat uklone fosforilnu skupinu s inhibiranog enzima i time vrate aktivnost katalitičkog mjesta kolinesteraze (Bismuth i sur. 1992). Kako bi bio spreman za ljudsku upotrebu, potrebno je da oksim zadovolji veliki broj

uvjeta prilikom pretkliničkih i kliničkih ispitivanja (Gupta 2005). Oksimi se međusobno razlikuju po učinkovitosti reaktivacije koja ovisi o njihovoj interakciji s OP spojem vezanim za AChE i mogućnosti da se suprotstave toksičnim učincima nastalim posljedicom djelovanja OP spoja u organizmu (Aragao 1996). U skupinu standardnih oksima ubrajamo 2-PAM, HI-6, obidoksim i TMB-4. Standardni oksimi posjeduju pozitivno nabijeni kvaterni dušikov atom u sklopu jednog ili dva piridinijeva prstena (tzv. kvaterni mono- ili bispiridinijevi oksimi) što otežava i usporava difuziju oksima kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) čime je pristup SŽS-u uvelike ograničen (Kusić i sur. 1985; Moore i sur. 1991; Thiermann i sur. 2010). Svaki od navedenih oksima drugačije je učinkovit u aspektu reaktivacije što ukazuje na visoku specifičnost djelovanja oksimskog antidota prema pojedinom OP spoju (Kuča i sur. 2005; Kuča i sur. 2007). Ograničen spektar djelovanja oksima prema OP spoju u pogledu reaktivacije, slaba penetracija kroz KMB i ograničena kemijska stabilnost oksima su razlozi koji su naveli na istraživanja s ciljem pronalaska učinkovitijih reaktivatora. Nedavno je sintetiziran neutralni oksim iz klase hidroksipiridinskih oksima nazvan JR595, koji se pokazao učinkovitim reaktivatorom ljudske AChE (hAChE) (Zorbaz i sur. 2018).

Svrha ovog diplomskog rada bila je određivanje farmakokinetičkih i farmakodinamičkih karakteristika hidroksipiridinskog oksima JR595 te procjena njegove učinkovitosti usporedbom *in silico* i *in vitro* karakteristika sa *in vivo* podacima dostupnih u literaturi. Za određivanje farmakokinetičkih karakteristika određena su fizikalno-kemijska i farmakokinetička (ADME, engl. *Absorption, Metabolism, Distribution, Elimination*) svojstva JR595 oksima korištenjem računalnog programa. Farmakodinamička karakterizacija bazirala se na određivanju konstanti inhibicije i reaktivacije na mišjem i ljudskom modelu AChE. Izmjerene su aktivnosti hAChE i mišje (mAChE) acetilkolinesteraze u ovisnosti o raznim koncentracijama supstrata acetiltiokolina (ATCh) kako bi se usporedili enzimi iz dviju vrsta. Nadalje, dodatna usporedba dvaju enzima temeljila se na određivanju afiniteta hAChE i mAChE prema nekoliko nabijenih (2-PAM, HI-6, obidoksim) i neutralnih (MINA, DAM, JR595) oksima. Za usporedbu s reaktivacijom ljudske inačice enzima određena je učinkovitost oksima JR595 u reaktivaciji mAChE inhibirane sarinom i VX-om praćenjem povratka aktivnosti inhibiranog enzima u prisutnosti različitih koncentracija oksima. Osim toga, uspoređeni su reaktivacijski parametri na sobnoj (25°C) i fiziološkoj (37°C) temperaturi kako bi se procijenio utjecaj *in vitro-in vivo* translacije farmakodinamičkog učinka reaktivatora. Konačno, dobiveni rezultati uspoređeni

su s literaturnim podacima o *in vivo* farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima oksima JR595.

## 2. LITERATURNI PREGLED

---

### 2.1. Kolinesteraze

#### 2.1.1. Općenito o kolinesterazama

Kolinesteraze (ChEs) prema enzimskoj nomenklaturi predstavljaju hidrolaze estera karboksilnih kiselina koje cijepaju estere kolina. AChE i butirilkolinesteraza (BChE; E.C. 3.1.1.8) dva su enzima iz skupine kolinesteraza koja su od primarne važnosti u pogledu istraživanja trovanja organofosforim (OP) spojevima (Taylor i Radić 1994). AChE se još naziva pravom ili specifičnom kolinesterazom jer pokazuje specifičnu aktivnost prema supstratu ACh, dok se BChE naziva psuedo ili nespecifičnom kolinesterazom, koja također katalizira razgradnju ACh, ali pokazuje veću specifičnost prema složenijim supstratima poput butirilkolina i/ili propionilkolina (Taylor i Radić 1994).

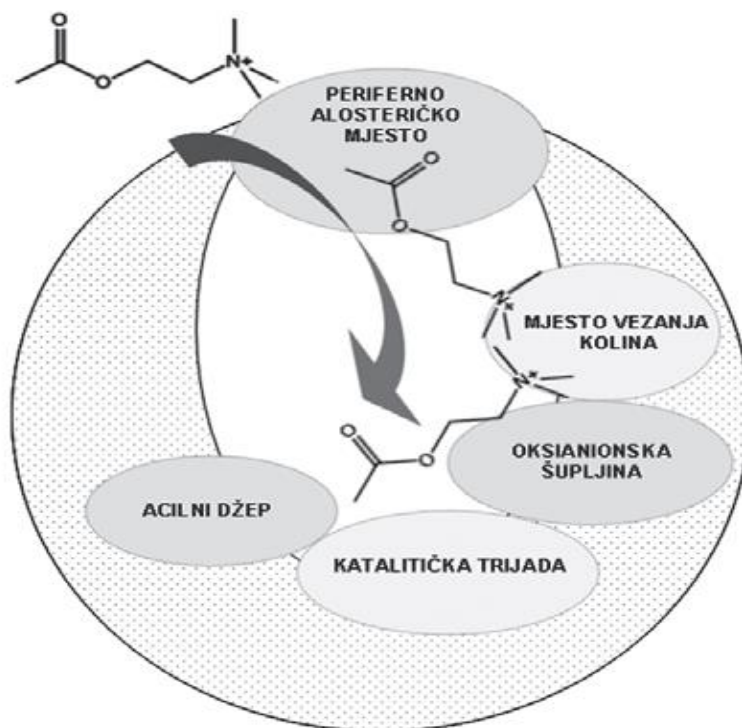
AChE se primarno nalazi u mišićima, mozgu i krvi. Razgradnjom svog specifičnog supstrata ACh u kolinergičnoj sinapsi, AChE kontrolira prijenos živčanog impulsa u SŽS-u i PŽS-u (Stryer 1991; Taylor i Radić 1994). BChE je prije svega prisutna u plazmi te u cerebrospinalnoj tekućini, crijevima, gušterači, jetri te živčanom sustavu. Za razliku od AChE, esencijalna fiziološka uloga ovog enzima nije razjašnjena, ali poznata je njezina uloga u biotransformaciji određenih lijekova i ksenobiotika, metabolizmu lipida i lipoproteina te ostalim fiziološkim i patofiziološkim procesima (Cokugras 2003).

#### 2.1.2. Struktura kolinesteraza

AChE i BChE klasificirane su u obitelj  $\alpha/\beta$  hidrolaza (Harel i sur. 1992; Taylor i Radić 1994; Darvesh 2003). Oba enzima mogu tvoriti monomere i homodimere čije su podjedinice povezane disulfidnom vezom između dva C-terminalna kraja (Sussman i sur. 1991) te homotetramere čiji su dimeri međusobno povezani tetramerizacijskom domenom na C-terminalnom kraju (Blong i sur. 1997; Altamirano i Lockridge 1999).

Aktivno mjesto oba enzima nalazi se na dnu uskog katalitičkog ždrijela čije su dimenzije 20 Å dužine i 5 Å širine (Harel i sur. 1993). Identificirano je pet domena koje čine aktivno mjesto oba enzima (**Slika 1.**): a) katalitička trijada koja ima esteraznu aktivnost, b) oksianionska šupljina koja stabilizira prijelazno stanje prilikom katalize supstrata (Froede i Wilson 1971; Rosenberry 1975), c) kolinsko mjesto važno za stabilizaciju pozitivno

nabijenog kvaternog dijela kolinskih supstrata, d) acilni džep odgovoran za smještanje acilnog dijela supstrata (Wilson i Quan 1958.) i e) periferno mjesto smješteno na otvoru ždrijela koje služi kao dodatno mjesto za interakciju sa supstratom ili ligandima (Taylor i Lapi 1975).



**Slika 1.** Shematski prikaz aktivnog mjesta ChEs sa strukturom supstrata ACh i strelicom koja označava smjer ulaska i pozicioniranje ACh u aktivnome mjestu kolinesteraza (preuzeto i prilagođeno iz: Bosak i sur. 2011).

Detalji strukture AChE te mehanizam njezine katalitičke aktivnosti detaljnije su opisani s obzirom da je ona mjerena u svrhu dobivanja rezultata za ovaj diplomski rad. Katalitička trijada i oksianionska šupljina zajedno predstavljaju tzv. esterazni dio enzima koji provodi katalitičku funkciju AChE (Roseberry 1975; Quinn 1987; Sussman i sur 1991; Bourne i sur. 1995; Harel i sur. 1996; Cheng i sur. 2007; Silman i Sussman 2008; Rosenberry 2010). Katalitičku trijadu ljudske AChE čine tri aminokiseline: Ser203, His447 i Glu334. Katalitička aktivnost AChE kao serinske hidrolaze podijeljena je na korak acilacije i deacilacije. Korak acilacije uključuje nukleofilni napad O-atoma aktivnog Ser203 na karbonilni C-atom supstrata, koji je praćen protonskim transferom sa Ser203 na His447 pri čemu Glu334 modulira histidin i sudjeluje u acido-baznoj katalizi. Uslijed toga dolazi do nastanka tetraedarskog prijelaznog stanja. U nastavku procesa proton se dalje prenosi na

izlaznu skupinu supstrata u svrhu formiranja acil-enzim kovalentnog kompleksa pri čemu se oslobađa kolin. Deacilacija predstavlja korak nukleofilnog napada molekule vode na karbonilni ugljik aciliranog enzima, pri čemu se oslobađa octena kiselina i enzim se vraća u prvobitno slobodno stanje.

Usporedba AChE iz čovjeka, miša i električne jegulje (*Torpedo californica*) pokazuje da tri enzima dijele 55% identičnih aminokiselina te 76 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu cijelih enzima (Slika 2.). Međutim, zbog 93% homologije u primarnoj strukturi aktivnog mjesta enzima (Zorbaz i sur. 2018), među kojima su svakako aminokiseline prije navedenih domena aktivnog mjesta, ne očekuje se značajna razlika u katalitičkoj aktivnosti enzima iz ovih vrsta.

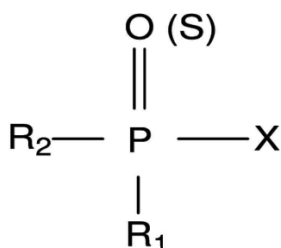


**Slika 2.** Usporedba primarne strukture AChE iz miša (mAChE), čovjeka (hAChE) i električne jegulje (TcAChE) (preuzeto iz: Zorbaz i sur. 2018).

## 2.2. Organofosforni spojevi

### 2.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva i važnost OP spojeva

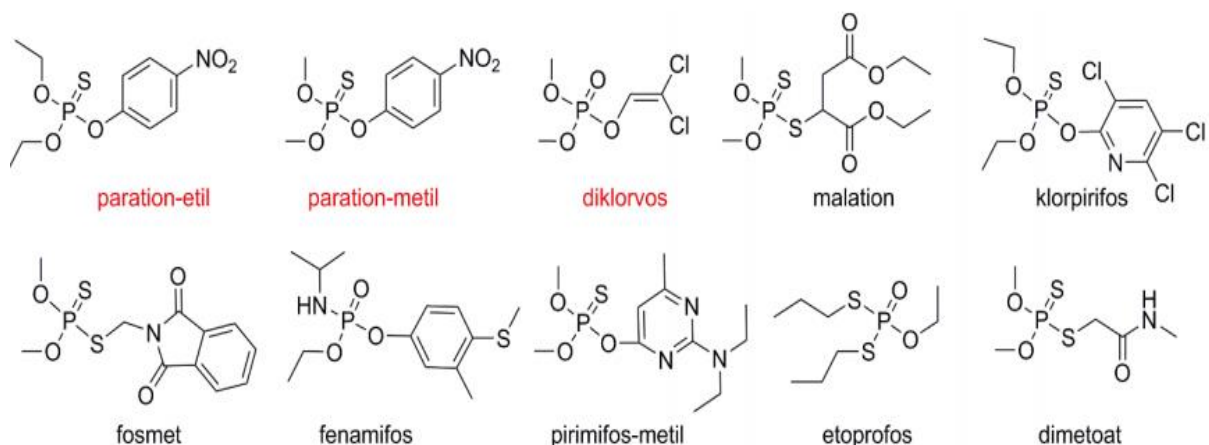
Prema svom podrijetlu, OP spojevi su kemijski sintetizirani spojevi koji predstavljaju estere, amide i tiole derivirane iz fosforne, fosfonske i fosfinske kiseline (**Slika 3.**). U čistom stanju, uz sitna odstupanja, OP spojevi su tekućine bez boje i mirisa. Većina OP spojeva je slabo topiva u vodi, imaju nizak tlak para što ih čini hlapivima te se razgrađuju procesom hidrolize do hidrofilnog produkta.



**Slika 3.** Osnovna struktura organofosfornog spoja. R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> predstavljaju oznake za arilnu i alkilnu skupinu koje su direktno ili preko atoma kisika (O) ili sumpora (S) vezane za atom fosfora (P). Oznaka X, također povezana s atomom P, predstavlja široki raspon elemenata halogene, alifatske, aromatske i heterocikličke skupine (preuzeto iz: Carullo i sur. 2015).

Razvoj prvih OP spojeva započeo je krajem 19. stoljeća kada je J. L. Lassaigne reakcijom alkohola i fosforne kiseline dobio trietil-fosfat. Godine 1854. sintetiziran je tetraetilpirosfat (TEPP) koji je korišten kao insekticid u području agrokulture. Visoka stopa sinteze OP spojeva kreće nakon Drugog svjetskog rata, a dva pesticida proizvedena u najvećim kvantitetama bila su paration i malation. Tijekom 1970-ih OP insekticidi (paration-etil, paration-metil, diklorvos) zabranjeni su za upotrebu zbog visoke otpornosti i akumulacije u okolišu. **Slika 4.** prikazuje ostale učestale OP pesticide među kojima su i tri zabranjena. Napredak u razvoju OP doveo je do njegove široke primjene u obliku pesticida (herbicidi, insekticidi, fungicidi) (Costa i sur. 2005).





**Slika 4.** Primjeri organofosforinih pesticida. Crveno su označeni pesticidi zabranjeni za korištenje.

### 2.2.2. Živčani bojni otrovi

Živčani bojni otrovi stekli su svoje ime zbog direktnog utjecaja na funkciju živčanog sustava organizma. Prvi poznati živčani bojni otrov, tabun, sintetiziran je 1930-ih od strane njemačkog kemičara Gerharda Schradera tijekom istraživanja na OP pesticidima. Kraj navedenog istraživanja rezultirao je razvojem G-serije živčanih bojnih otrova u koju, osim tabuna, ubrajamo sarin i soman (López-Muñoz i sur. 2008). Do 1960-ih razvijeni su brojni živčani bojni otrovi među kojima je i VX iz V-serije te predstavlja unaprijeđenu verziju G-serije. U usporedbi sa sarinom, VX je pokazao veću stabilnost, manju hlapljivost i manju hidrofilnost što ga čini potentnijim otrovom (Stuart i sur. 2003). U svom čistom stanju, svi bojni otrovi predstavljaju bezbojne tekućine. U **Tablici 1.** prikazana su najbitnija fizikalno-kemijska svojstva.

**Tablica 1.** Fizikalno-kemijska svojstva OP spojeva: olfaktorna svojstva, molarna masa M, vrelište  $T_v$ , topivost u vodi S te poluvrijeme hidrolize  $t_{1/2}$ .

| OP spoj      | Olfaktorna svojstva            |             | M / g mol <sup>-1</sup> | $T_v$ / °C | S / g dm <sup>3</sup> | $t_{1/2}$ / h |
|--------------|--------------------------------|-------------|-------------------------|------------|-----------------------|---------------|
| <b>Tabun</b> | Bezbojna do smečkasta tekućina | Voćni miris | 162,1                   | 240        | 98 (20°C)             | 8,5 (pH 7,0)  |
| <b>Sarin</b> | Bezbojna tekućina              | Bez mirisa  | 140,1                   | 158        | Miješa se             | 39 (pH 7,0)   |
| <b>Soman</b> | Bezbojna tekućina              | Voćni miris | 182,2                   | 190        | 21 (20°C)             | 45 (pH 6,6)   |
| <b>VX</b>    | Gusta bezbojna tekućina        | Bez mirisa  | 267,4                   | 298        | 20 (20°C)             | 1000 (pH 7,0) |

### 2.2.3. Mehanizam toksičnosti OP spojeva

Mehanizam toksičnosti OP temelji se na ireverzibilnoj inhibiciji AChE, a odvija se putem kemijske reakcije u kojoj se hidroksilna skupina Ser aktivnog mjesta progresivno fosfilira. Brzina fosfilacije ovisi o vrsti OP spoja, odnosno o arilnoj i alkilnoj skupini koje su vezane za atom fosfora (P) (Aldridge 1950). Visoki afinitet AChE prema OP spoju proizlazi iz sličnosti strukture OP spoja s tetraedarskim prijelaznim stanjem koji nastaje prilikom katalize hidrolize ACh. Za razliku od aciliranog enzima, koji deacilacijom obnavlja svoju katalitičku aktivnost uslijed katalize hidrolize supstrata, defosfilacija enzima (spontana reaktivacija) je u većini slučajeva toliko spora da se inhibicija enzima OP spojem smatra ireverzibilnom. Inhibicija AChE uzrokuje nakupljanje neurotransmitera ACh u sinapsama živčanog sustava te prekomjernu stimulaciju nikotinskih (nAChR) i muskarinskih (mAChR) acetilkolinških receptora SŽS-a i PŽS-a što pak rezultira razvojem nikotinskih i muskarinskih simptoma. Muskarinski simptomi posljedica su prekomjerne stimulacije parasimpatičkog sustava i uključuju miozu zjenica, prekomjernu salivaciju, bradikardiju i abdominalnu bol, a nikotinski simptomi posljedica su poremećaja funkcije autonomnih ganglija i uključuju tahikardiju i hipertenziju. Ostali specifični simptomi vezani za različita tkiva, organe i SŽS prikazani su u **Tablici 2**. U najtežim slučajevima trovanja razvija se paraliza respiratornih mišića i inhibicija respiratornog centra što dovodi do smrti (Benschop i De Jong 1988; Sidell 1997; Marrs 2007).

**Tablica 2.** Simptomi trovanja OP spojevima podijeljeni prema nikotinskim (nAChR) i muskarinskim (mAChR) receptorima.

| Vrsta receptora     | Podtipovi receptora | Područje mehanizma                         | Simptomi  |
|---------------------|---------------------|--|---|
| Nikotinski (nAChR)  | N1                  | Neuromuskularna sinapsa                    | fascikulacije, grčevi, paraliza                                     |
|                     | N2                  | Autonomni gangliji<br>Nadbubrežna žlijezda | tahikardija,<br>hipertenzija  |
| Muskarinski (mAChR) | M1-M5               | Središnji živčani sustav                   | ataksija, koma,<br>anksioznost,<br>respiratorna depresija           |
|                     | M2                  | Srce                                       | bradikardija,<br>hipotenzija  |
|                     | M3,M2               | Oko  | mutan vid, mioza  |
|                     | M3,M2               | Egzokrine žlijezde                         | dijareja, povećana<br>okularna lakrimacija,<br>prekomjerno znojenje |
|                     | M3, M2              | Glatki mišići                              | abdominalna bol,<br>bronhospazam                                    |

Sistemske simptome trovanja OP spojevima se javljaju nakon što je inhibirano više od 50% enzima, a smrt nastupa nakon 90% inhibiranog enzima (Moretto 1998). U većini slučajeva, simptomi uzrokovani različitim OP spojevima slični su, dok su njihova apsorpcija, distribucija, metabolizam i potencijal inaktivacije različiti (Gupta 2015; Worek i sur. 2020). Toksični potencijal živčanih bojnih otrova za čovjeka kreće od najtoksičnijeg redom VX > sarin ~ soman > tabun za unos inhalacijom te redom VX > soman ~ tabun > sarin za unos putem kože (Gupta 2015).

#### 2.2.4. Terapija i antidoti za živčane bojne otrove

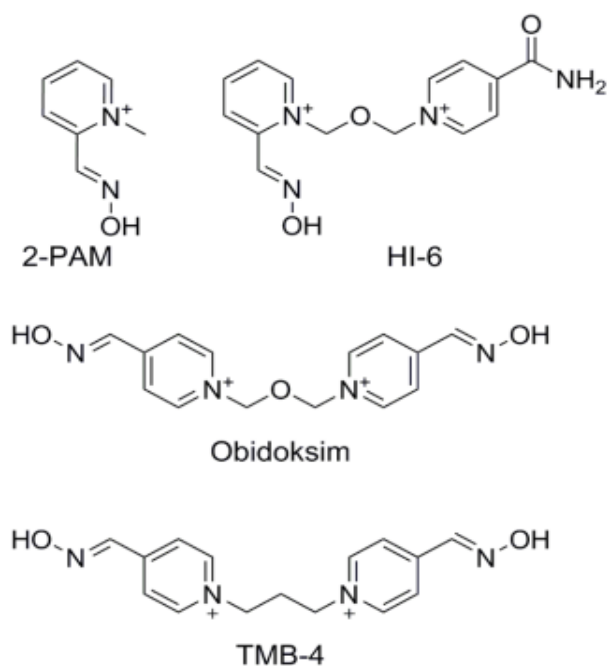
Neposredno nakon kontakta sa živčanim bojnim otrovom, obvezna je provedba hitne njege na izloženoj osobi te transport u odgovarajuću ustanovu kako bi se proveo puni tretman. Tijekom tretmana, osoblje uvodi mjere opreza kako bi spriječilo vlastitu kontaminaciju živčanim bojnim otrovom (Sidell 1997). Današnja terapija koja se primjenjuje nakon akutnog trovanja OP spojevima dijeli se na ne-farmakološku i farmakološku. Ne-farmakološka terapija uključuje proces reanimacije, opskrbu kisikom i metode dekontaminacije. U farmakološku terapiju uključene su tri skupine lijekova: lijek s

antikolinergičnim djelovanjem (pr. atropin) koji je antagonist muskarinskih receptora tijekom nakupljanja ACh unutar kolinergičnih sinapsi, depresori SŽS-a koji se ponašaju kao antikonvulzivi (pr. diazepam) i oksimi kao reaktivatori inhibirane AChE (Somani i sur. 1992; Sidell 1997; Cannard 2006; McDonough i Shih 2007).

Atropin ulazi u kompeticiju s ACh za mAChR te na taj način sprječava prekomjernu stimulaciju navedenog receptora vlastitim neurotransmitterom. Diazepam se upotrebljava u svrhu ublažavanja nastalih konvulzija i mišićnih grčeva nastalih tijekom akutne intoksikacije živčanim bojnim otrovom. Oksimi, za razliku od prethodno opisanih simptomatskih lijekova, djeluju kao nukleofili snažniji od vode te imaju mogućnost reaktivacije inhibirane AChE. Mehanizam reaktivacije temelji se na nukleofilnom napadu aniona oksimske skupine (oksimat) na elektrofilni ostatak OP spoja pri čemu se stvara konjugat oksim-OP, a kao rezultat navedenog kovalentna veza između enzim-OP konjugata puca i enzim je ponovno aktivan. Reaktivacija je moguća ako pretpostavimo da fosfilirani enzim nije ušao u proces starenja (engl. *aging*). Starenje predstavlja dealkilaciju, tj. spontano odcjepljenje alkilnog dijela od fosfil-alkoksi ostatka OP spoja vezanog za Ser203, pri čemu nastaje enzim-OP konjugat koji nije moguće reaktivirati niti oksimima (Shafferman i sur. 1996).

## 2.3. Farmakologija oksimskih reaktivatora acetilkolinesteraze

Sredinom prošloga stoljeća, nakon što Wilson i sur. otkrivaju snažne oksimske nukleofile koji reaktiviraju AChE inhibiranu OP spojem, posljedično dolazi do razvoja različitih oksimskih vrsta u svrhu tretmana inhibirane AChE (Wilson 1959; Froede i Wilson 1971; Wilson i Ginsburg 1955). Prvi oksim dostupan za uporabu, 2-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijev iodid (2-PAM), razvijen je gotovo simultano 1955. u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i Velikoj Britaniji (VB) (Childs i sur. 1955; Wilson i Ginsburg 1955). Za razliku od ostalih lijekova, upotreba oksima u svijetu nije univerzalna te se razlikuje po državama. Dok većina europskih država koristi obidoksim (Toxogonin®), SAD nemaju licenciranu uporabu obidoksima te koriste 2-PAM. Kanada također koristi 2-PAM, ali Kanadske Oružane Snage podnijele su peticiju s kojom bi HI-6 zamijenio trenutni 2-PAM. Izrael, kao bliskoistočna država, koristi TMB-4 (Bentur i sur. 2006). Navedeni oksimi predstavljaju tzv. standardne oksime te su prikazani na **Slici 5**. Iako se koriste u terapijske svrhe, reaktivacijski potencijal oksimskih antidota uvelike je ograničen te postoji potreba za razvojem novih i učinkovitijih oksima (Worek i sur. 2020).



**Slika 5.** Formule standardnih oksima (2-PAM, HI-6, obidoksim i TMB-4).

### 2.3.1. Farmakodinamika i farmakokinetika oksimskih antidota

Farmakodinamika je definirana kao kvantitativno proučavanje odnosa između primjenjene doze, tj. koncentracije lijeka i njegove učinkovitosti u organizmu. U najvažnije značajke farmakodinamike ubrajamo: receptorski mehanizam, doza-odgovor krivulju i terapijski indeks lijeka. Receptorski mehanizam opisuje način vezanja lijeka na staničnoj razini, doza-odgovor krivulja vizualizira odnos doze lijeka i željenog učinka, dok terapijski indeks omogućava uvid u omjer toksičnosti i učinkovitosti lijeka. Farmakokinetika proučava način na koji organizam procesira lijek i obuhvaća apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju lijeka (ADME prema engl. *Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion*). Odnos između farmakodinamike i farmakokinetike oksimskog antidota biti će opisan u nastavku.

Dostupna koncentracija lijeka u krvi ovisi o njegovoj brzini apsorpcije, načinu administracije, brzini distribucije te brzini i načinu eliminacije. Apsorpcija označava brzinu i opseg pri kojem lijek putuje od mjesta administracije do krvotoka (Allen 1982), što prvenstveno određuje koncentraciju lijeka u krvi u usporedbi sa primjenjenom dozom. Različiti načini administracije lijeka rezultiraju drugačijom biodostupnosti lijeka. Oralna administracija (*p.o.* od lat. *per os*) lijeka predstavlja jedan od najpogodnijih načina primjene koji omogućava sistemski učinak lijeka, ali vrlo niska biodostupnost uzrokovana sporom apsorpcijom i mogućnošću enzimske razgradnje lijeka u gastrointestinalnom traktu (GIT) čini navedeni način administracije nepoželjnim za primjenu oksimskog antidota. Također, proces difuzije kojim se lijek apsorbira putem oralne primjene nepogodan je za hidrofилne spojeve poput oksima. Za razliku od *p.o.* intravenozni (*i.v.*) način primjene omogućava 100%-tnu biodostupnost primijenjene doze, dok ireverzibilnost efekta lijeka uslijed vrlo brze apsorpcije predstavlja jedan od nedostataka ovakvog načina primjene. Intramuskularni (*i.m.*) način primjene predstavlja najčešći tip administracije u pogledu primjene oksimskih antidota zbog visokog postotka biodostupnosti (75–100%) i mogućnosti korištenja autoinjektora prigodnih za hitni tretman. Nakon apsorpcije, slijedi proces distribucije čija su brzina i opseg kontrolirani fiziološkim faktorima. Brzina distribucije često je pod utjecajem brzine apsorpcije i krvne perfuzije određenog tkiva, a opseg distribucije ovisi o topivosti molekule, vezanju za proteine plazme ili tkiva (PPB prema engl. *plasma protein binding*) i  $pK_a$  vrijednostima funkcionalnih skupina lijeka, odnosno njegovoj nabijenosti (Siepmann i sur. 2016; Lin i sur. 2017). Dok lipofilne molekule vrlo lagano prolaze kroz fosfolipidnu staničnu membranu, kretanje hidrofилnih molekula odvija se sporo pasivnim transportom. Električki

neutralne molekule pokazuju bolju topivost u lipidima (lipofilnost) te imaju veću mogućnost penetracije u različita tkiva organizma. To je dovelo do razvoja oksimskih spojeva bez kvaternog dušika tj. stalnog pozitivnog naboja koje nazivamo neutralnim oksimima (Mitragotri i sur. 2014; Sánchez-López i sur. 2017). Nadalje, eliminacija lijeka definirana je kao uklanjanje lijeka iz krvi putem bubrega (renalna eliminacija), jetre (hepatička eliminacija) te ostalih manje bitnih puteva (izdahom ili znojenjem). Eliminacija hidrofilnih lijekova, ovisno o veličini molekula, odvija se filtracijom kroz nefrone kojom ti lijekovi dopijevaju u mjehur (eliminacija urinom), a lipofilni lijekovi eliminiraju se putem jetre i žučnog kanala u duodenum tankog crijeva (eliminacija fecesom). Lipofilni lijekovi često podliježu metabolizmu u jetri kojim se prevode u hidrofilnije i lakše izlučive spojeve, a glavni enzimi uključeni u taj proces spadaju u citokrom P450 metaboličke enzime (CYP) (Lewis i sur. 2004).

### **2.3.2. Farmakološki profil standardnih oksima i njihovi nedostaci**

Upotreba prvog standardnog oksima u svrhu reaktivacije AChE inhibirane OP spojem počinje 1955. nakon sinteze 2-PAM monopiridinijevog oksima. Nekoliko godina nakon, Lüttringhaus i Hagedorn sintetiziraju obidoksim (Toxogonin<sup>®</sup>) iz skupine bispiridinijevih oksima koji se pokazao kao znatno potentiji reaktivator prema OP spojem inhibiranoj AChE (Erdmann i Clarmann 1963; Lüttringhaus i Hagedorn 1964). HI-6, oksim iz serije sintetizirane pod vodstvom Else Hagedorn, pokazuje iznimnu učinkovitost u reaktivaciji AChE inhibirane širokim spektrom OP spojeva, ali je potpuno neučinkovit u slučaju tabuna. Niska vrijednost topivosti i brzine otapanja HI-6 dikloridne soli onemogućavaju otapanje potrebnih količina u cilju postizanja terapijskih učinaka. Međutim, zemljom klorida sa dimetilsulfidom (DMS) stvara se HI-6 DMS sa znatno većom topivosti i brzinom otapanja. Bundeswehr Medical Service namjerava razviti autoinjektor koji će u kombinaciji sadržavati atropin sulfat, HI-6, DMS i hidrofilni benzodiazepin (pr. Avifazon, Midazolam) kako bi unaprijedili i prilagodili terapiju namijenjenu intoksikaciji živčanim bojnim otrovima. Općenito, učinkovitost oksima kao reaktivatora ovisi o afinitetu inhibiranog enzima za oksim te o reaktivacijskom nukleofilnom potencijalu prema specifičnom fosfiliranom konjugatu AChE. Reaktivacijski, odnosno nukleofilni potencijal definiran je udjelom oksima s deprotoniranom oksimskom skupinom (oksimatni oblik) vezanog za piridinijev prsten što ovisi o  $pK_a$  oksimske skupine. Afinitet pak ovisi o raznim fizikalno-kemijskim svojstvima same molekule (pr. sterička kompatibilnost, elektrostatski učinci, hidrofobne interakcije) te njenim interakcijama s

aminokiselinama fosfiliranog enzima. Farmakodinamički profil oksimskog reaktivatora stoga ovisi o njegovoj strukturi i o strukturi OP spoja, odnosno o njegovom dijelu koji nakon fosfiliranja ostaje vezan na katalitički serin.

Svi pozitivno nabijeni piridinijevi oksimi imaju međusobno slične farmakološke profile. Pokazuju dobru i brzu apsorpciju (5-10 min) nakon *i.m* primjene te dolazi do brze distribucije u dobro perfundirana/prokrvljena tkiva. Njihova biotransformacija (metabolizam) nema veliki značaj za njihovu biološku aktivnost, jer se uglavnom iz organizma eliminiraju nepromijenjeni. Proces eliminacije odvija se brzo renalnim putem što potvrđuje hidrofilni karakter standardnih oksima.

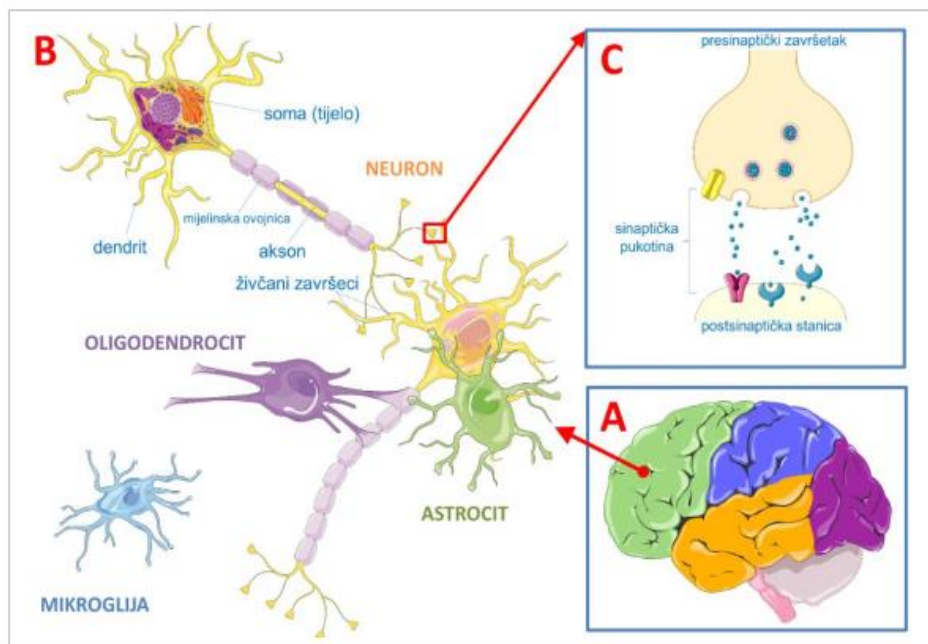
Terapijska učinkovitost standardnih oksima je trenutno kontroverzna tema. Niti jedan od standardnih oksima nije djelotvoran za trovanje sa svim OP spojevima, odnosno nemaju univerzalnost čime je njihova primjena otežana (Jokanović i Stojiljković 2006). Nadalje, postoji mogućnost da se djelotvorne koncentracije oksima zadržavaju prekratko u organizmu kako bi imali reaktivacijski učinak na ciljna tkiva. Stoga ako se terapija oksimom ne primjenjuje dovoljno dugo, postoji mogućnost reinhibicije AChE jer OP spojevi radi svoje lipofilnosti ostaju neko vrijeme od trovanja pohranjeni u tkivima otrovane osobe. Još jedan farmakološki nedostatak standardnih oksima je njihov slab prolazak kroz krvno-moždanu barijeru (KMB). Trajno pozitivan naboj kvaternog dušikovog atoma otežava transport kroz KMB što rezultira malim koncentracijama oksimskog antidota u SŽS-u, manjim od 10 % njihove koncentracije u krvi (Kalász i sur. 2015).



## 2.4. Dizajn reaktivatora s djelovanjem na središnji živčani sustav

### 2.4.1. Središnji živčani sustav

SŽS je građen od mozga i leđne moždine koji su međusobno povezani moždanim deblom. Mozak je smješten u lubanji gdje je podijeljen na četiri režnja i građen od otprilike 100 bilijuna neurona i 1000 bilijuna potpornih glija stanica (**Slika 6.A**; **Slika 6.B**), a leđna moždina proteže se spinalnim kanalom te se iz nje grana 31 par spinalnih živaca. Mozak upravlja motoričkim aktivnostima, stvara memoriju, kontrolira sekreciju hormona, omogućuje sposobnost rješavanja problema te razne sposobnosti od visoke važnosti za organizam, dok leđna moždina provodi informacije iz mozga u periferiju i obrnuto. Mjesto putem kojeg neuroni međusobno komuniciraju kemijskim ili električnim prijenosom signala naziva se sinapsa (**Slika 6.C**). Neurotransmiteri prenose informacije iz presinaptičkog do postsinaptičkog završetka neurona ili postsinaptičke mišićne ili žljezdane stanice koja prima informaciju.



**Slika 6.** A) Prikaz mozga s različito obojenim režnjevima, B) Neuron i glija stanica (mikroglia, astrociti i oligodendrociti), C) Prikaz sinapse koja se sastoji od presinaptičkog živčanog završetka (akson), sinaptičke pukotine te postsinaptičke stanice (dendrit ili soma) (preuzeto i prilagođeno iz: Zorbaz 2018).

## 2.4.2. Krvno-moždana barijera

Krvno moždana barijera (KMB) je selektivno propusna barijera čija je glavna uloga održavanje homeostaze SŽS-a što je ključno za pravilno funkcioniranje neurona te zaštitu SŽS-a od toksina, patogena, upala, ozljeda i bolesti (Zlokovic 2008; Daneman 2012). KMB je specifična za moždanu mikrovaskulaturu jer posjeduje niz dodatnih svojstava koja omogućuju visoku preciznost pri kontroli prijenosa molekula, iona i stanica između krvi i SŽS-a za razliku od žila koje opskrbljuju ostala tkiva organizma.

KMB je građena od više tipova stanica: epitelnih stanica koje formiraju membrane krvnih žila te potpornih stanica poput pericita i astrocita smještenih na vanjskoj površini epitelnog sloja (Sims 1986; Aird 2007). Funkcija KMB kao zaštitne barijere većinski se manifestira putem epitelnih stanica, ali indukcija, održavanje te funkcije omogućeni su interakcijom epitelnih stanica sa pericitima, imunološkim i glija stanicama. Moždane epitelne stanice (MES) razlikuju se od perifernih epitelnih stanica (PES). Prvo, PES dopuštaju makromolekularno kretanje (pr. proteini) kroz vlastitu staničnu membranu koje se odvija putem receptorom potaknute transcitoze (RMT prema engl. *Receptor-Mediated Transcytosis*) ili apsorpcijom potaknute transcitoze (AMT prema engl. *Adsorptive-Mediated Transcytosis*). Navedena dva procesa ne javljaju se učestalo u MES. RMT se odvija prihvaćanjem određenog liganda za receptor čime nastaje alveola koja se odvaja u vezikulu, a disocijacija liganda odvija se tijekom staničnog prijenosa ili tijekom egzocitoze na albuminalnu stranu. AMT je odgovorna za unos većih kationskih molekula, peptida i pozitivno nabijenih proteina. Drugo, PES posjeduju fenestracije, tj. otvore koji omogućuju transport svih molekula male molekularne mase, dok MES nisu fenestrirane te su usko povezane sa susjednom stanicom u svrhu efektivnog zatvaranja moždanih vaskularnih odjeljaka.

S obzirom na lipofilnost fosfolipidnog dvosloja stanične membrane, difuzija molekula najviše ovisi o njihovoj lipofilnosti i molekularnoj masi. Kao posljedica navedenog, samo molekule plinova poput O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> i NO<sub>2</sub> prolaze slobodno. Nadalje, transfer lipofilnih molekula djelomično je ograničen molekularnom masom (<400-600 Da), a spojevi poput etanola, nikotina i diazepama, čija su lipofilnost i masa ispod odgovarajuće granice, imaju iznimno visoku permeabilnost (Laterra 1999). Iako lipofilni, brojne ksenobiotike SŽS prepoznaje kao štetne te se oni kao takvi transportiraju nazad u krvotok putem ABC transportera lociranih na endotelnim stanicama. Hidrofilne molekule nemaju mogućnost

slobodnog prolaska te se njihov transport u mozak zasniva na aktivnom transportu specifičnim transporterima.

### 2.4.3. Pristupi u dizajnu oksimskih reaktivatora s djelovanjem na SŽS

WHO procjenjuje brojku od 200000 smrtnih slučajeva na godišnjoj razini uzrokovanih trovanjem OP spojevima. Trenutni oksimski reaktivatori u upotrebi (pr. 2-PAM, HI-6, obidoksim) s obzirom na svoju selektivnost ne predstavljaju zadovoljavajući tretman u svrhu reaktivacije AChE inhibirane s različitim OP spojevima. Dok u periferiji organizma pokazuju mogućnost reaktivacije, slab prolaz kroz KMB onemogućava značajan utjecaj na SŽS, tj. na ublažavanje ili uklanjanje neurotoksičnih učinaka OP spojeva (Clement 1982; Kassa 2002; Bajgar 2004). Kako bi pronašli odgovarajući tretman, osim bolje penetracije lijeka u SŽS, potrebno je postići odgovarajući afinitet enzim-OP konjugata prema oksimu te odgovarajuću koncentraciju i vrijeme aktivnosti lijeka unutar organizma. Trenutno je razvijeno nekoliko različitih pristupa u dizajnu oksimskih antidota s ciljem preciznije i kvalitetnije dostave u SŽS. Direktna dostava oksimskog antidota uključuje primjenu injektora te upotrebu pristupa za poboljšanu dostavu lijeka (pr. nanočestice, liposomi). Nanočestice mogu biti organskog ili sintetičkog podrijetla. Njihova veličina ne prelazi 1000 nm, poboljšavaju transport lijeka ciljano u mozak te imaju mogućnost zaštititi lijek od enzimske razgradnje. Nakon *i.v.* administracije, nanočestice putuju krvotokom do KMB kroz koju prolaze raznim mehanizmima endocitoze. Konjugat nanočestica-ligand zajedno s fizikalno-kemijskim svojstvima nanočestice određuje mehanizam prolaska kroz KMB. Neke od bitnijih uloga liganada (pr. apolipoproteini, transferini) nevedenog konjugata su posredovanje i poboljšanje prijenosa u mozak te direktna interakcija sa odgovarajućim receptorom epitelnih stanica KMB-e.

Manipulacija fizikalno-kemijskim svojstvima molekula (pr. lipofilnost) u svrhu poboljšanja prijenosa lijeka kroz KMB pasivnim transportom jedan je od učestalijih pristupa kojim se pokušava unaprijediti prolazak oksimskog antidota u SŽS. Povećanje lipofilnosti molekule ima za cilj povećani transport kroz fosfolipidni dvosloj endotelne stanice KMB. Ugrađivanjem atoma fluora (F) u heterociklički prsten piridinijevih oksima rezultiralo je povećanom lipofilnosti i penetracijom nevedne skupine oksima (Jeong i sur. 2009) Koristeći metodu permeabilnosti paralelnih umjetnih membrana (PAMPA prema engl. *parallel artificial membrane permeability assay*) pokazala se pozitivna korelacija između povećanja stupnja permeabilnosti i broja F atoma vezanih na heterociklički prsten oksima te su tako di-

fluorirani oksimi pokazali veću permeabilnost kroz membranu nego mono-fluorirani oksimi (Jeong i sur. 2009). Nažalost, fluorirani analozi su pokazali bolju penetraciju kroz KMB, ali ne i veći stupanj reaktivacije od standardnih oksima.

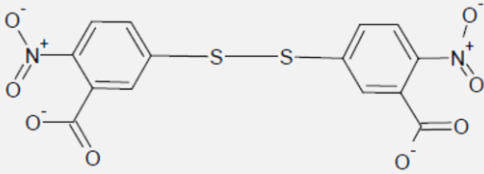
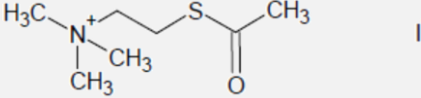
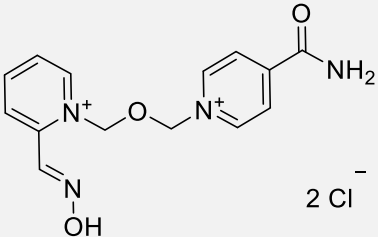
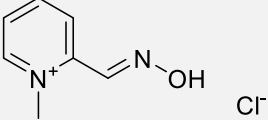
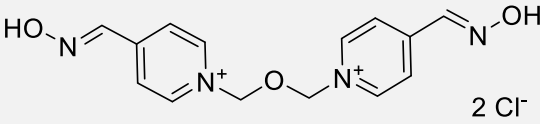
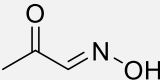
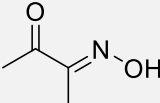
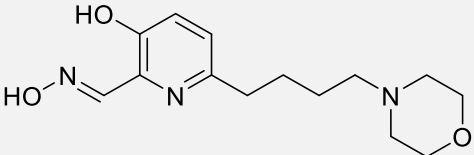
## 3. MATERIJALI I METODE

---

### 3.1. Kemikalije i enzimski preparati

U svim kinetičkim mjerenjima korišten je  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  natrijev fosfatni pufer pH=7,4 pripremljen titracijom otopina  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  pri temperaturi  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (DTNB) (**Tablica 3.**) (Sigma-Aldrich, SAD), pripremljena je kao 6 ili  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  otopina u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  natrij fosfatnom puferu pH=7,4 te čuvana pri  $4^\circ\text{C}$ . Kao supstrat korišten je acetiltiokolin jodid (ATCh) (**Tablica 3.**) (Sigma-Aldrich, SAD). Za izvor enzima korišteni su uzorci ljudske eritrocitne acetilkolinesteraze ( $\text{hAChE}_{\text{Erc}}$ ) dobivene od dobrovoljnog davatelja krvi na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, rekombinantna ljudska acetilkolinesteraza ( $\text{hAChE}_{\text{rec}}$ ) pripremljena u *Departement de Toxicologie et Risques Chimiques, Institut de Resherche Biomedicale des Armees*, Bretigny-sur-Orge, Francuska, i rekombinantna mišja acetilkolinesteraza ( $\text{mAChE}_{\text{rec}}$ ) pripremljena u *Department of Pharmacology, University of California*, San Diego, SAD. U pokusima reverzibilne inhibicije kao reverzibilni inhibitori korišteni su oksimi: HI-6, 2-PAM, obidoksim, DAM i MINA (**Tablica 3.**). Oksim JR595 (**Tablica 3.**) korišten je u pokusima reverzibilne inhibicije i u pokusima reaktivacije kao reaktivator inhibirane AChE.

**Tablica 3.** Strukturne formule reaktanata korištenih u eksperimentima te njihova funkcija.

| NAZIV      | STRUKTURA  | FUNKCIJA |
|------------|--|----------|
| DTNB       |    | Reagens  |
| ATCh       |    | Supstrat |
| HI-6       |     | Oksim    |
| 2-PAM      |    | Oksim    |
| Obiodoksim |  | Oksim    |
| MINA       |   | Oksim    |
| DAM        |   | Oksim    |
| JR595      |  | Oksim    |

### 3.2. *In silico* određivanje fizikalno-kemijskih i farmakokinetičkih parametara

Za analizu molekularnih te osnovnih farmakokinetičkih svojstava korišteni su *Molecular Properties* i *ADMET Descriptors* protokoli dostupni unutar *BIOVIA Discovery Studio Client* računalnog programa (v.18.1.100.18065, 2017, Dassault Systèmes, San Diego). Molekularna svojstva koja su analizirana protokolom *Molecular Properties* su: naboj, AlogP, AlogD, molekularna masa, logS, pK<sub>a</sub>, HBA (engl. *hydrogen bond acceptor*), HBD (engl. *hydrogen bond donor*), RB (engl. *rotatable bonds*) i PSA (engl. *polar surface area*). U protokolu *ADMET Descriptors* analizirana su topljivost molekule, apsorpcija molekule iz intestinalnog trakta u krvotok, vezanje na proteine plazme, prolazak kroz KMB, inhibicija CYP2D6 metaboličkog enzima te hepatotoksični potencijal molekule. U nastavku u **Tablicama 4.-6.** su kategorije za pojedine parametre prema vrijednostima te njihovo značenje.

**Tablica 4.** Kategorije intestinalne apsorpcije (ADMET\_Absorption\_Level) nakon oralne primjene lijeka, pripadajuće vrijednosti za ADMET\_Absorption vrijednosti određene temeljem 2D strukture molekule te značenje rezultata.

| Kategorija | Vrijednost ADMET_Absorption (Abs.)                    | Značenje              |
|------------|---|-----------------------|
| 0          | Abs. <6,1261 (unutar 95%) <sup>1</sup>                | dobra apsorpcija      |
| 1          | 6,1261 < Abs. < 9,6026 (unutar 99%)                   | srednja apsorpcija    |
| 2          | 9,6026 < Abs. (van 99%)                               | niska apsorpcija      |
| 3          | ADMET_PSA_2D ≥ 150,<br>ADMET_AlogP98 ≤ -2,0 ili ≥ 7,0 | jako niska apsorpcija |

<sup>1</sup> 95% spojeva za koje je predviđena dobra apsorpcija nalaze se unutar površine omeđene elipsom „95%“, koja uključuje spojeve s povoljnom korelacijom vrijednosti ADMET\_AlogP98 i ADMET\_PSA\_2D; <sup>2</sup> značenje za 99% analogno značenju za 95%.

**Tablica 5.** Kategorije topljivosti spoja u vodi (ADMET\_Solubility\_Level) prema predviđenoj vrijednosti logaritma molarne topljivosti (logSw) spoja iz modela linearne regresije dobivene za eksperimentalnu i predviđenu topljivost 775 spoja podatkovne baze (*training set*).

| Kategorija | Vrijednost logSw        | Vjerojatnost da molekula bude lijek |
|------------|-------------------------|-------------------------------------|
| 0          | $\log Sw < -8,0$        | Iznimno niska                       |
| 1          | $-8,0 < \log Sw < -6,0$ | Ne, vrlo niska, ali moguće          |
| 2          | $-6,0 < \log Sw < -4,1$ | Da, niska                           |
| 3          | $-4,1 < \log Sw < -2,0$ | Da, dobra                           |
| 4          | $-2,0 < \log Sw = 0,0$  | Da, optimalna                       |
| 5          | $0,0 < \log Sw$         | Ne, previše topljivo                |

**Tablica 6.** Kategorije penetracije kroz krvno-moždanu barijeru (ADMET\_BBB) nakon oralne primjene te pripadne vrijednosti logaritma omjera predviđenih koncentracija spoja u mozgu i krvi (logBB) te značenje.

| Kategorija | Vrijednost logBB         | Značenje  |
|------------|--------------------------|---|
| 0          | $\log BB \geq 0,7$       | Vrlo visoka penetracija: omjer koncentracija spoja u mozgu i krvi veći od 5:1         |
| 1          | $0 \leq \log BB < 0,7$   | Visoka penetracija: omjer koncentracija spoja u mozgu i krvi veći između 1:1 i 5:1    |
| 2          | $-0,52 \leq \log BB < 0$ | Srednja penetracija: omjer koncentracija spoja u mozgu i krvi veći između 0,3:1 i 1:1 |
| 3          | $\log BB \leq -0,52$     | Niska penetracija: omjer koncentracija spoja u mozgu i krvi manja od 0,3:1            |
| 4          | nije definirano          | Izvan elipse označene kao 99% pouzdane  |

ADMET\_EXT\_PPB model ispituje vjerojatnost da udio molekula vezana na protein plazme bude visok ( $\geq 90\%$ ). Računalni model na temelju kojeg je napravljen ovaj model uključivao je 854 spoja s poznatim vezanjem za proteine plazme. Pritom je korišten Bayesov model računalnog učenja za koji je pokazano da ima osjetljivost 0,866 (raspon 0-1) i specifičnost 0,770 (raspon 0-1). Spojevi koji su prema Bayesovom modelu bodovani sa



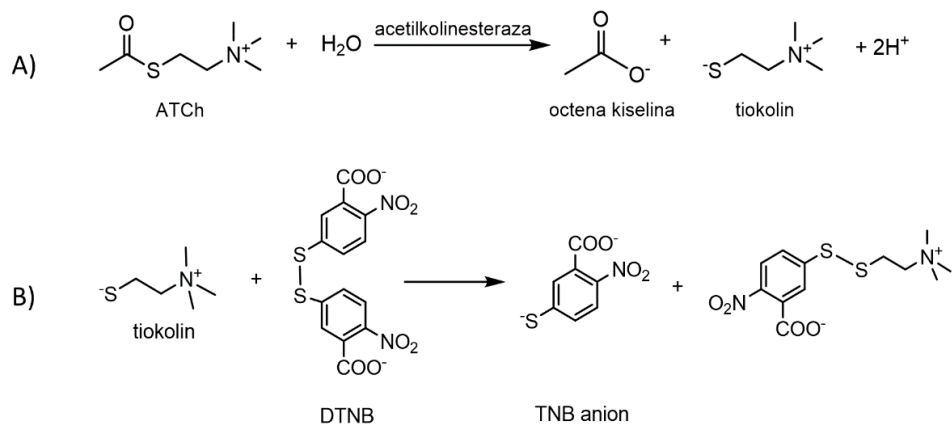
vrijednošću većom od -2,209 klasificirani kao spojevi koji se u visokom udjelu ( $\geq 90\%$ ) vežu za proteine plazme.

ADMET\_EXT\_CYP2D6 model predviđa inhibiciju CYP2D6 metaboličkog enzima koristeći 2D strukturu molekule. Računalni model za procjenu inhibicije ovog enzima određen je prema setu od 151 strukturno različita spoja s poznatim konstantama inhibicije za CYP2D6. Pritom je korišten Bayesov model računalnog učenja za koji je pokazano da ima osjetljivost 0,812 (raspon 0-1) i specifičnost 0,854 (raspon 0-1). Spojevi koji su prema Bayesovom modelu bodovani sa vrijednošću većom od 0,161 klasificirani su kao inhibitori CYP2D6.

ADMET\_hepatotoxic model razvijen je prema literaturnim podacima za 436 spoja koji dokazano uzrokuju toksičan učinak na jetru: pozitivni na promjene (hepatocelularne, koleostatične ili neoplastične) ovisne o dozi ili povišuju aminotransferaznu aktivnost u krvi u više od 10% populacije povezano uz određenu dozu koja djeluje kao okidač. Pritom je korišten Bayesov model računalnog učenja za koji je pokazano da ima osjetljivost 0,913 (raspon 0-1) i specifičnost 0,750 (raspon 0-1). Spojevi koji su prema Bayesovom modelu bodovani sa vrijednošću većom od -4,154 klasificirani su kao hepatotoksični.

### 3.3. Mjerenje kinetičke aktivnosti enzima

Kinetička aktivnost enzima mjerena je acetiltiokolinskim supstratom, ATCh, pri 25°C spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu (Ellman i sur 1961). Finalna reakcijska smjesa za mjerenje enzimske aktivnosti sadržavala je 0,33 mmol dm<sup>-3</sup> DTNB, 0,1 mol dm<sup>-3</sup> natrij fosfatni pufer (pH= 7,4), 0,01% goveđi serumski albumin (BSA; Sigma-Aldrich, SAD) te supstrat ATCh čija je koncentracija bila ovisna o tipu pokusa. AChE katalizira reakciju hidrolize supstrata ATCh pri čemu se oslobađa tiokolin (**Slika 7.A**) koji reagira s tiolnim DTNB reagensom pri čemu nastaje anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (**Slika 7.B**). Nastanak tog aniona određuje se mjerenjem apsorpcije pri valnoj duljini  $\lambda = 412$  nm, a ima molarni apsorpcijski koeficijent  $\epsilon = 14250$  dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> i daje žutu boju otopini. Mjerenje aktivnosti koje počinje dodatkom supstrata trajalo je minimalno 2 minute. Finalno razrjeđenje enzima bilo je određeno na način da enzimska aktivnost  $\Delta A/\text{min}$  sa 1 mM ATCh bude oko vrijednosti 0,1. Mjerenja aktivnosti su rađena na spektrofotometru CARY 300 (Varian-Australia), termostatiranom na 25 °C.



**Slika 7.** Reakcija hidrolize supstrata acetiltiokolina acetilkolinesterazom u tiokolin i octenu kiselinu (A) i reakcija tiokolina sa reagensom DTNB uz nastajanje žutog aniona 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (B).

### 3.3.1. Mjerenje reverzibilne inhibicije

Proces reverzibilne inhibicije postignut je i mjereno uz korištenje standardnih i neutralnih oksima kao inhibitora. Korišteni oksimi bili su: HI-6, 2-PAM, DAM i MINA. Određivanje inhibicije enzima provodilo se mjerenjem enzimске aktivnosti enzima pri različitim koncentracijama supstrata ATCh ( $0,05-0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) i uz različite koncentracije oksima kao reverzibilnih inhibitora. Reakcijska smjesa za određivanje inhibicije enzima na CARY 300 spektrofotometru (Varian Inc., Australia) bila je ukupnog volumena 1 mL i sastojala se od 50  $\mu\text{L}$  DTNB ( $6 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), 830  $\mu\text{L}$  natrij fosfatnog pufera ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ; pH = 7,4), 50  $\mu\text{L}$  enzima odgovarajućeg razrjeđenja, 20  $\mu\text{L}$  inhibitora odgovarajućeg razrjeđenja i naposljetku 50  $\mu\text{L}$  dodanog supstrata ATCh odgovarajućeg razrjeđenja. Veći dio pokusa reverzibilne inhibicije mjereno je u reakcijskoj smjesi volumena 300  $\mu\text{L}$  s jednakim finalnim koncentracijama reaktanata u jažicama mikrotitarskih pločica pomoću čitača Tecan Infinite M200PRO (Tecan Group Ltd., Švicarska). Usporedno sa reakcijskim smjesama koje sadrže oksime kao inhibitore, mjerena je i kontrolna enzimska aktivnost bez inhibitora. Ujedno je određena vrijednost neenzimske reakcije, u kojoj su prisutne sve iste komponente reakcijske smjese osim enzima, kako bi se odredio potencijal hidrolize ATCh samim oksimom (tzv. oksimoliza). Od apsorbancije inhibirane probe oduzeta je apsorbancija neenzimske probe. Za reakciju inhibicije svakog enzima sa pojedinim oksimom izvedena su minimalno tri eksperimenta.

### 3.3.2. Reaktivacija fosforiliranih kolinesteraza korištenjem oksima

Reaktivacija fosforiliranih kolinesteraza korištenjem oksima određivana je mjerenjem povratka aktivnosti mAChE ireverzibilno inhibirane sarinom ili VX-om u određenim vremenskim točkama od dodatka oksima u reaktivacijsku smjesu. Enzim mAChE je inkubiran sa sarinom ili VX-om u vremenu od oko 60 min do postizanja 100 % inhibicije aktivnosti enzima. Nakon inkubacije, suvišak OP spoja je uklonjen pomoću filtracijske kolonice Strata<sup>®</sup> 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, alikvot uzorka inhibiranog enzima je potom razrijeđen u reaktivacijskoj smjesi koja sadržava određenu koncentraciju oksima čime je započet proces reaktivacije. U određenom vremenu (1 – 180 min) od početka reaktivacije, alikvoti 10  $\mu\text{L}$  reaktivacijske

smjese su razrijeđeni u reakcijskoj smjesi za mjerenje aktivnosti enzima koja je sadržavala  $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$  DTNB u fosfatnom puferu ukupnog volumena  $940 \mu\text{L}$ . Mjerenje aktivnosti započeto je dodatkom  $50 \mu\text{L}$  supstrata ATCh finalne koncentracije  $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Tijekom dvije minute mjerenja aktivnosti promjena apsorbancije s vremenom bila je linearna. Identičan postupak proveden je i s neinhibiranim uzorkom enzima kako bi se utvrdile kontrolne vrijednosti aktivnosti enzima u prisutnosti ispitivanih koncentracija oksima. Sva mjerenja enzimske aktivnosti u eksperimentima reaktivacije izvedena su na spektrofotometru CARY 300 (*Varian Inc.*, Australia).

### 3.4. Korištene jednadžbe i obrada podataka

Računi, statistička obrada i vizualizacija podataka izrađeni su u odgovarajućem programu GraphPad Prism6 (GraphPad Inc., San Diego, SAD).

#### 3.4.1. Katalitičke konstante

Katalitičke konstante enzimske kintetike,  $K_M$  (Michaelisova konstanta koja predstavlja koncentraciju supstrata potrebnu za 50% brzine reakcije u odnosu na  $V_{\text{max}}$ ) i  $V_{\text{max}}$  (maksimalna brzina reakcije pri zasićenoj koncentraciji supstrata), određene su po Michaelis-Menteninoj jednadžbi iz eksperimentalno određene aktivnosti enzima ( $v$ ) pri različitim koncentracijama supstrata  $[S]$ :

$$v = V_{\text{max}} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (1)$$

#### 3.4.2. Konstante reverzibilne inhibicije

Reverzibilna inhibicija ostvaruje se stvaranjem adicijskog kompleksa između enzima i inhibitora vezanjem inhibitora na aktivno i/ili periferno mjesto enzima. Postotak inhibicije enzima ne mijenja se s vremenom izloženosti enzima inhibitoru, nego njihovom koncentracijom, a stupanj reverzibilne inhibicije definiran je konstantom disocijacije i jednadžbom prema Hunter-Downsu:

$$K_{\text{app}} = \frac{v_i \cdot [I]}{v_0 - v_i} \quad (2)$$

$v_0$  i  $v_i$  predstavljaju aktivnosti enzima u odsutnosti i prisutnosti inhibitora koncentracije  $[I]$  mjerene uz istu koncentraciju supstrata.  $K_{app}$  (konstanta disocijacije inhibitora i enzima) je prividna jer se reakcija između enzima i inhibitora odvija u prisutstvu supstrata koji može imati utjecaj na jačinu inhibicije. Preuređenjem jednačbe (2) dobiva se novi oblik:

$$\frac{v_0}{v_i} = 1 + \frac{1}{K_{app}} \cdot [I] \quad (3)$$

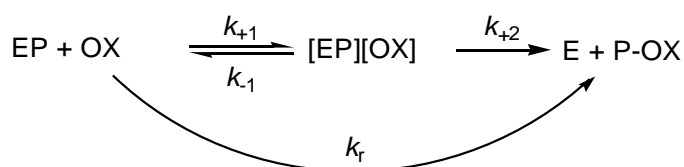
Utjecaj supstrata na reverzibilnu inhibiciju u aktivnom mjestu moguće je opisati Hunter-Downsovom jednačbom:

$$K_{app} = K_i + \frac{K_i}{K_s} \cdot [S] \quad (4)$$

gdje  $K_i$  predstavlja konstantu disocijacije inhibitora i enzima u aktivnom mjestu enzima, a  $K_s$  konstantu disocijacije kompleksa enzim-supstrat Michaelisovog tipa. Za izračunavanje  $K_i$  korištena je jednačba (4), gdje je  $K_i$  odsječak na ordinati.

### 3.4.3. Konstante reaktivacije

Uklanjanjem fosforilne skupine sa serina AChE postiže se procesom reaktivacije. Reaktivacija se opisuje sljedećom shemom (Shema 1):



Shema 1.

gdje EP predstavlja fosfilirani enzim,  $[\text{EP}][\text{OX}]$  reverzibilni kompleks Michaelis-Menteninog tipa između EP i oksima (OX), E je slobodni enzim, a P-OX fosfilirani oksim. Dodatno,  $k_{+2}$  je konstanta brzine reaktivacije prvog reda (konstanta brzine nukleofilne supstitucije između oksima i OP ostatka vezanog na katalitički serin<sup>203</sup>), a  $k_r$  je ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda. Reakcija reaktivacije (5) opisana je jednačbom:

$$\ln \frac{[\text{EP}]_0}{[\text{EP}]_t} = \frac{k_{+2} \cdot [\text{OX}]}{K_{OX} \cdot [\text{OX}]} \cdot t = k_{obs} \cdot t \quad (5)$$

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  $[\text{EP}][\text{OX}]$

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:

$$k_r = \frac{k_{+2}}{K_{OX}} \quad (6)$$

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

$$Reakt = \frac{v_{(EP+OX)_t}}{v_{(E+OX)}} \cdot 100\% \quad (7)$$

gdje  $v_{(EP+OX)_t}$  predstavlja aktivnost reaktiviranog enzima oksimom u vremenu  $t$ , dok  $v_{(E+OX)}$  predstavlja aktivnost neinhibiranog enzima u prisutnosti oksima (kontrolna aktivnost). Ovisnost postotka reaktivacije dobivenog za pojedinu koncentraciju oksima (7) o vremenu reaktivacije  $t$  obično slijedi izgled jednofazne eksponencijalne krivulje (reaktivacijska krivulja) izražene jednadžbom:

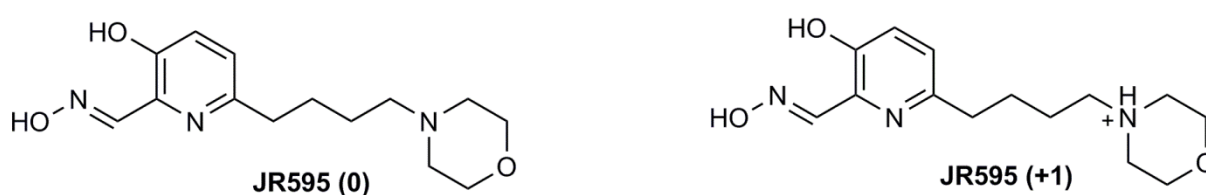
$$Reakt = Reakt_{max} \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) \quad (8)$$

gdje je  $Reakt_{max}$  maksimalni ostvaren postotak reaktivacije. Vrijednost  $k_{obs}$  za svaku koncentraciju oksima je određena direktno iz jednadžbe (8) 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 (5). Kada je testirani raspon koncentracija pojedinog oksima pratio nelinearnu ovisnost jednadžbe (5) bilo je moguće odrediti reaktivacijske parametre  $k_{+2}$  i  $K_{OX}$  te je  $k_r$  izračunata pomoću jednadžbe (6). Za sve izračune reaktivacijskih parametara korišten je GraphPad Prism6 (GraphPad Inc., San Diego, SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1. *In silico* procjena farmakokinetike JR595 oksima

Pomoću *Discovery Studio Client* računalnog programa analizirana su molekularna te osnovna farmakokinetička svojstva oksima JR595, a dobiveni parametri prikazani su u **Tablici 7**. Posebno su analizirana dva oblika oksima JR595 prisutna pri fiziološkom pH: neutralni oblik JR595 (0) i oblik s protoniranim dušikom u morfolinskom prstenu (+1) (**Slika 8**).



**Slika 8.** Neutralni oblik JR595 (0) i nabijeni oblik JR595 (+1) koji se u najvećem udjelu nalaze pri fiziološkom pH 7,4.

Molekularna svojstva važna za procjenu prolaska molekule kroz membrane, bilo intestinalne ili KMB, uključuju one parametre koji govore o naboju, lipofilnosti, polarnosti i fleksibilnosti molekule. Ukupni naboj može se procijeniti prema konstantama disocijacije kiseline za ionizirajuće skupine molekule, tj.  $pK_a$  vrijednostima. Lipofilnost molekule opisana je koeficijentom razdjeljenja molekula između oktanol i vode ( $\log P$ ), ali još važniji je koeficijent razdjeljenja ovisan o stupnju ionizacije molekule pri pH 7,4 ( $\log D$ ). Polarnost molekule reflektirana je u ukupnom broju akceptora i donora vodikovih veza unutar molekule (HBA i HBD, prema engl. *hydrogen bond acceptor/donor*) i području polarne površine molekule (PSA, prema engl. *polar surface area*). Prema predviđenim  $pK_a$  vrijednostima ionizirajućih skupina, molekula JR595 pri fiziološkom pH nalazi se u svom neutralnom i nabijenom obliku. Neutralni oblik pokazuje veću tendenciju otapanja u lipidnom sloju (veći  $\log P$ ) nego nabijeni oblik. Konačna lipofilnost molekule JR595 koja pri pH 7,4 ima veći udio neutralnog oblika od nabijenog reflektira se u vrijednosti  $\log D=1,45$ . Za molekulu koja se smatra potencijalnim lijekom, poželjan je iznos  $\log P$  između 0 i 5 (Pajouhesh i Lenz 2005).

**Tablica 7.** Molekularna i farmakokinetička svojstva određena računalnim programom *Discovery Studio Client*.

|                                       | Opis i/ili mjerna jedinica   | JR595 (0)                 | JR595 (+1)        |
|---------------------------------------|--|---------------------------|-------------------|
| <b>Protokol: Molecular Properties</b> |  |                           |                   |
| Naboj                                 | Formalni naboj molekule.   | 0                         | 1                 |
| pK <sub>a</sub>                       | Logaritam konstante disocijacije kiseline K <sub>a</sub> ionizirajućih skupina molekule  | 6,18 / 7,28 / 8,96 / 9,05 |                   |
| MW                                    | Molekularna masa molekule (g mol <sup>-1</sup> )   | 279,335                   | 280,166           |
| ALogP                                 | Logaritam koeficijenta razdjeljenja između oktanola i vode   | 1,694                     | 0,133             |
| LogD                                  | Logaritam koeficijenta razdjeljenja između oktanola i vode pri pH 7.4 ovisno o ionizacijskom stanju molekule                     | 1,447                     |                   |
| HBA                                   | Broj akceptora vodikovih veza u molekuli   | 3                         |                   |
| HBD                                   | Broj donora vodikovih veza u molekuli  | 1                         |                   |
| Molecular_PSA                         | Područje polarne površine (Å <sup>2</sup> ) prema 2D aproksimaciji   | 78,18                     | 79,38             |
| RB                                    | Broj veza koje se mogu rotirati (fleksibilnost molekule)   | 6                         |                   |
| <b>Protokol: ADMET Descriptors</b>    |  |                           |                   |
| ADMET_Solubility Level                | Koeficijent topljivosti logSw<br>Kategorička razina topljivosti  | -2.014<br>4               | -0.683<br>3       |
| ADMET_ALogP98                         | Logaritam partijskog koeficijenta između oktanola i vode   | 1,714                     | 0,153             |
| ADMET_PSA_2D                          | Područje polarne površine (Å <sup>2</sup> )  | 76,497                    | 76,349            |
| ADMET Absorption Level                | Kategorička razina apsorpcije iz gastrointestinalnog sustava u krv   | 0                         |                   |
| ADMET_BBB Level                       | Logaritam (koncentracije u mozgu)/(koncentracije u krvi) logBB<br>Kategorička razina penetracije kroz KMB                        | -0.835<br>3               | -1.315<br>3       |
| ADMET_EXT_PPB                         | Bodovanje prema Bayesovom modelu za ispitivanje vezanja molekule na proteine plazme u visokom postotku (≥ 90%)<br>Rezultat testa | -7.43665<br>false         | -10.0498<br>false |
| ADMET_EXT_CYP2D6                      | Bodovanje prema Bayesovom modelu za ispitivanje inhibicije CYP2D6 enzima<br>Rezultat testa                                       | -1.03742<br>false         | -4.82446<br>false |
| ADMET_hepatotoxic                     | Bodovanje prema Bayesovom modelu za ispitivanje hepatotoksičnog potencijala<br>Rezultat testa                                    | -7.46528<br>false         | -2.44908<br>true  |



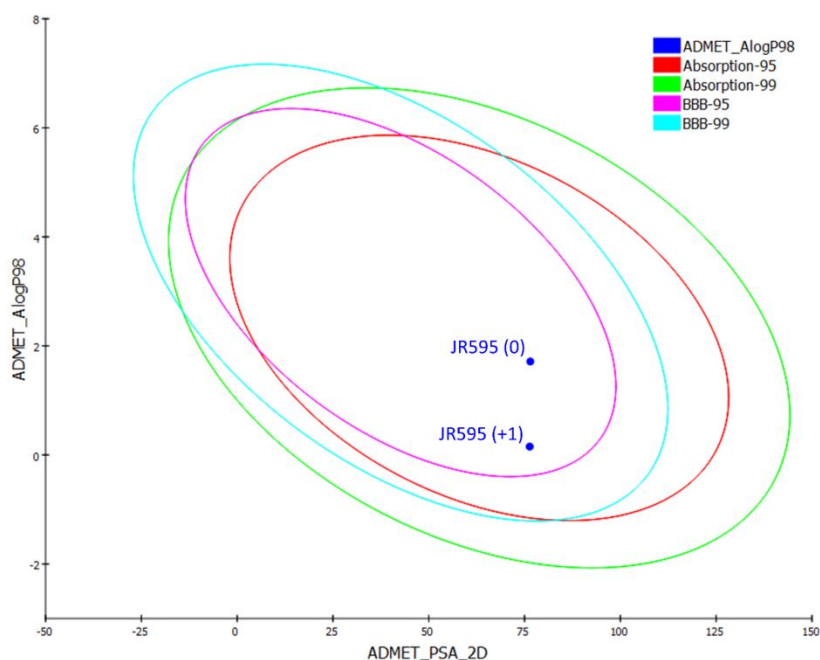
Osim toga, manja molekularna masa omogućava bolji pasivni transport kroz lipidnu membranu KMB. Prema Levinu, granica za mogući prolazak kroz KMB je 400 Da ili manje, dok Waterbeemd predlaže 450 Da ili manje (Levin 1980; Atkinson 2002). Navedeni rasponi navode na zaključak da neutralni i protonirani oblik JR595 posjeduje odgovarajuću masu za penetraciju u SŽS te da, očekivano, nema značajnih razlika u brojkama između dva tipa. Parametri HBA, HBD i PSA reflektiraju heteroatome prisutne u molekuli i opisuju njezinu polarnost i potencijal da stvara vodikove veze s fosfolipidima membrane što može otežati pasivni transport kroz membrane. Preporučene gornje granice za navedene parametre jesu: HBA=7, HBD=3, PSA=60-70 Å<sup>2</sup> (Pajouhesh i Lenz 2005). Za analizirana dva oblika JR595 iz tablice, HBA i HBD vrijednosti su unutar preporučenih i očekivano su potpuno jednake za dva oblika JR595, jer ne ovise o naboju molekule. Također, za vrijednost PSA uočena su minimalna odstupanja. Međutim, procijenjene vrijednosti PSA nepoželjne su što bi moglo biti uzrokom ipak slabijeg prolaska molekule JR595 kroz KMB. Uz lipofilnost lijeka, molekularna fleksibilnost je stavka koja bitno utječe na transport lijeka kroz membranu, a određena je brojem veza koje se rotiraju (RB) u molekuli. Umjerena fleksibilnost predstavlja prednost pri prolasku lijeka kroz membranu, a preporuka za maksimalan broj RB je 8 (Pajouhesh i Lenz 2005).

Vjerojatnost da se će se molekula koristiti kao lijek ovisi prvenstveno o njezinim farmakokinetičkim svojstvima, ali i vjerojatnošću da ne izaziva interakcije s metabolizmom drugog lijeka koji može biti primjenjivan kod pacijenta ili da nema toksičan učinak na vitalne organe. Prvi i osnovni preduvjet da se molekula primjenjuje kao lijek je njegova topivost u vodi. Topljivost u vodi jedan je od problema kod više od 40% novorazvijenih farmakoloških lijekova. Lijek zahtjeva odgovarajući stupanj topljivosti u vodi jer je za njegovu apsorpciju nužno da bude primijenjen u obliku otopine. Prema računalnoj analizi topljivosti, nabijeni oblik JR595 sa vrijednosti 4 spada u kategoriju spojeva s optimalnom topljivošću za aplikaciju, dok neutralni spoj spada u kategoriju dobre topljivosti (3).

Apsorpcija lijeka određena je njegovom mogućnosti transcelularnog i paracelularnog prolaza kroz membranu, tj. ukupnom permeabilnosti. Vrijednosti iz **Tablice 7.** ukazuju na dobru apsorpciju oba tipa (kategorija 0), a ona je u direktnoj korelaciji sa poželjnim vrijednostima područja polarne površine (ADMET\_PSA\_2D) i lipofilnosti (ADMET\_ALogP98) oba oblika spoja JR595. Nakon što se apsorbira u krvotok, lijek može biti distribuiran u razna tkiva te naposljetku eliminiran. U krvi lijek se može vezati za proteine plazme poput albumina i alfa kiselog glikoproteina što potencijalno smanjuje njegovu efikasnost jer je manja koncentracija lijeka dostupna za odlazak i interakciju s

ciljnom molekulom. ADMET\_PPB parametar rezultat je ispitivanja točnosti tvrdnje da je udio molekula vezan na protein plazme  $\geq 90\%$ , i za slučaj JR595 spoja dobiveni rezultat „netočno“ predviđa poželjno slabije vezanje oksima na proteine plazme.

Prema „ADMET\_BBB level“ modelu analize, oba oblika spoja JR595 svrstani su u kategoriju spojeva niskog potencijala za prolazak kroz KMB (3). Tom kategorijom su definirani spojevi za koje je očekivani omjer koncentracija u mozgu i krvi manji od 0.3:1, tj. u mozgu se ne očekuje više od 30% koncentracije spoja u krvi. ADMET\_Absorption i ADMET\_BBB modeli temelje se na predikcijskim elipsama u grafu ovisnosti predviđenog koeficijenta lipofilnosti i područja polarne površine (**Slika 9**).



**Slika 9.** ADMET profil za nabijeni (+1) i nenabijeni (0) oblik oksima JR595. Predikcijske elipse koje obuhvaćaju spojeve s onim vrijednostima lipofilnosti (AlogP98) i područja polarne površine (PSA\_2D) koje pogoduju intestinalnoj apsorpciji i prolasku kroz krvno-moždanu barijeru (BBB) s granicama pouzdanosti od 95% i 99%.

Predikcijska elipsa predstavlja područje u kojem se predviđaju koordinate, tj. broj novih opservacija iz određene populacije s pretpostavkom da je navedena populacija bivarijabilna s normalnom distribucijom. **Slika 9.** prikazuje predikcijske elipse sa vlastitim intervalima pouzdanosti. Konkretnije, elipsa s intervalom pouzdanosti od 95% ukazuje na područje u kojem se očekuje 95% opservacija iz populacije za ispitivani model (pr. 95% molekula koje prolaze kroz KMB nalazit će se unutar granica te elipse), dok elipsa s intervalom pouzdanosti od 99% ukazuje na područje u kojem se očekuje 99% opservacija iz populacije za ispitivani model. U našoj analizi, napravljene se dvije predikcijske elipse (95% i 99%) za spojeve koji

imaju potencijal intestinalne apsorpciji te dvije predikcijske elipse (95% i 99%) za spojeve s mogućnosti prolaska kroz KMB nakon oralne primjene. Neutralni oblik JR595 pokazuje relativno centraliziran položaj unutar sve četiri elipse, što potvrđuje da taj spoj prema svojim vrijednostima ADMET\_AlogP98 i ADMET\_PSA\_2D pripada skupini lijekova koji pogoduju intestinalnoj apsorpciji i prolazu kroz KMB u organizmu. Centralni položaj ukazuje na srednju vrijednost parametara opservacije u odnosu na sve uzorke unutar elipse. Nabijeni oblik JR595 također se nalazi unutar sve četiri elipse, ali u relativno rubnim područjima. Uspoređujući koordinate nabijenog i neutralnog oblika oksima JR595 unutar elipsa, očekuje se da će neutralni oblik imati bolju intestinalnu apsorpciju i prodor kroz KMB, kako je i očekivano.

Kao dio ADMET analize, ispitivanja je li molekula inhibitor CYP2D6 metaboličkog enzima jetre ili ima li hepatotoksični potencijal dio su regulatornih procedura u otkrivanju i razvoju novih lijekova. CYP2D6 predstavlja jednu od najučestalijih izoformi CYP porodice enzima te je uključen u metabolizam širokog spektra lijekova i njegova inhibicija predstavlja opasnost od interakcije potencijalnog lijeka s postojećim lijekom koji se potencijalno može davati pacijentu. Također, lijekovi s mogućnosti inhibicije navedenog enzima potencijalno mogu inhibirati vlastiti metabolizam te je poželjno da lijek ima što manji postotak inhibicije CYP2D6 zbog sprječavanja prekomjernog nakupljanja i toksičnog efekta u krvnoj plazmi. *In silico* analiza je procijenila da spoj JR595 u oba oblika nije inhibitor CYP2D6. S druge strane, za nabijeni oblik JR595 predviđen je hepatotoksični potencijal.

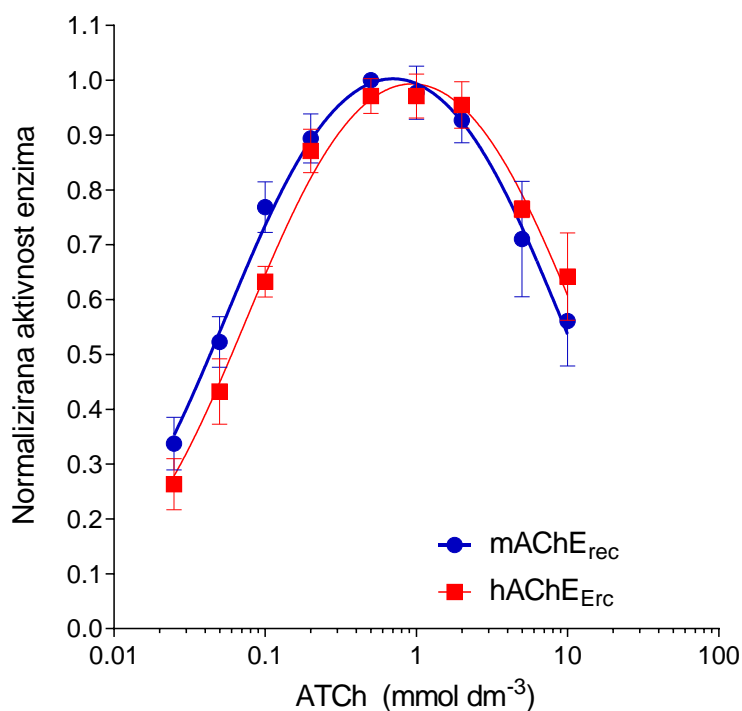
## 4.2. Procjena farmakodinamičkog profila oksima *in vitro* kinetičkim metodama

Za procjenu farmakodinamičkog profila oksima *in vitro* kinetičkim metodama uspoređeni su modeli kako bi se utvrdilo ima li razlike među vrstama na razini molekularne mete lijeka, tj. AChE enzima. To je prije svega učinjeno određivanjem aktivnostima mAChE i hAChE u ovisnosti o koncentraciji supstrata ATCh te određivanjem afiniteta nativnog enzima prema standardnim (2-PAM, HI-6, obidoksim) i neutralnim oksimima (MINA, DAM, JR595). Zatim je utvrđen reaktivacijski potencijal JR595 na modelu mAChE koja je prethodno inhibirana sarinom ili VX-om u ovisnosti o različitim koncentracijama oksima. Dodatno je ispitan utjecaj povišenja temperature sa sobne (25°C) na fiziološku (37°C) na reaktivacijski potencijal JR595 u slučaju mAChE inhibirane sarinom.

### 4.2.1. Usporedba aktivnosti ljudske (hAChE) i mišje (mAChE) acetilkolinesteraze

Usporedba enzima iz dvaju različitih izvora (mišja i ljudska) temeljena je na mjerenju ovisnosti enzimske aktivnosti o koncentraciji supstrata ATCh te su obje pS krivulje, krivulje s logaritamskom skalom koncentracije supstrata, prikazane na **Slici 10**. Iz navedenog prikaza vidimo jednak zvonoliki profil ovisnosti aktivnosti mAChE<sub>rec</sub> i hAChE<sub>erc</sub>. Točnije, oba enzima dostižu maksimalnu brzinu aktivnosti pri koncentraciji ATCh oko 1 mmol dm<sup>-3</sup>, dok pri većim koncentracijama ATCh dolazi do inhibicije enzimske aktivnosti supstratom. Takav profil uobičajen je za ovisnost aktivnosti AChE o ATCh i ACh supstratima (Nachmansohn i Rosenberg 1945). Kao razlog inhibicije supstratom, navodi se vezanje druge molekule supstrata u području perifernog alosteričkog mjesta aktivnog ždrijela AChE (Harel i sur. 1993). Iz dobivenih ovisnosti, određene su konstante vezanja za komplekse enzim-supstrat (ES), Michaelisova konstanta  $K_M$ , i konstanta vezanja druge molekule supstrata na ES kompleks (SES),  $K_{SS}$ . Navedene konstante prikazane su u **Tablici 8**. Michaelisova konstanta predstavlja koncentraciju supstrata potrebnu za ostvarivanje 50% vrijednosti od maksimalne brzine ( $1/2 V_{max}$ ) enzima. Niža vrijednost konstante  $K_M$  za mAChE<sub>rec</sub> ukazuje na veći afinitet prema ATCh u odnosu na hAChE<sub>erc</sub> te iz hiperbola (**Slika 10**.) možemo zaključiti da je nešto manja koncentracija istog supstrata potrebna kako bi se ostvarila  $V_{max}$  kod mišje inačice enzima. Zbog većeg afiniteta prema ACTh, mAChE<sub>rec</sub> također ima nižu konstantu inhibicije ( $K_{SS}$ ) i time je potrebna niža koncentracija supstrata koja će uzrokovati prezasićeno stanje i inhibiciju katalitičke aktivnosti enzima vezanjem

druge molekule supstrata u aktivno mjesto što posljedično uzrokuje neproduktivno vezanje. Međutim, navedene razlike također ne predstavljaju značajne razlike koje bi utjecale na mehanizme reakcija prikazanih u nastavku (reverzibilna inhibicija i reaktivacija oksimima). U radu Kovarik i sur. (2003) određene konstante vezanja supstrata ATCh za  $mAChE_{rec}$  su iznosile  $K_M = 0,047 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a  $K_{SS} = 9,6 \text{ mmol dm}^{-3}$ , što je usporedivo s ovdje dobivenim rezultatima za  $mAChE$ .



**Slika 10.** Ovisnost normalizirane aktivnosti mišje ( $mAChE_{rec}$ ) i ljudske ( $hAChE_{Erc}$ ) acetilkolinesteraze o koncentraciji supstrata acetiltiokolina (ATCh).

**Tablica 8.** Konstante vezanja određene za ljudsku AChE ( $hAChE_{Erc}$ ) i mišju ( $mAChE_{rec}$ ) acetilkolinesterazu i supstrat acetiltiokolina (ATCh): Michaelisova konstanta,  $K_M$ , i konstanta inhibicije supstratom,  $K_{SS}$ .

| Konstante vezanja                 | $hAChE_{Erc}$     | $mAChE_{rec}$     |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| $K_M$ (mmol dm <sup>-3</sup> )    | $0,079 \pm 0,006$ | $0,058 \pm 0,005$ |
| $K_{SS}$ (mmol dm <sup>-3</sup> ) | $11,1 \pm 1,1$    | $8,6 \pm 0,9$     |

#### 4.2.2. Reverzibilna inhibicija hAChE i mAChE sa standardnim i neutralnim oksimima

Prava konstanta inhibicije ( $K_i$ ) za pojedini oksim predstavlja vrijednost inhibicije koja nije pod potencijalnim utjecajem koncentracije supstrata. Određena je kao sjecište pravca x i y-osi koordinatnog sustava gdje vrijednost na x-osi (koncentracija supstrata) iznosi 0, prema Hunter-Downsovoj jednadžbi (4). Konstante inhibicije mAChE<sub>rec</sub> i ljudske eritrocitne hAChE<sub>erc</sub> sa standardnim oksimima 2-PAM, HI-6, obidoksimom te prvom generacijom neutralnih oksima DAM i MINA prikazane su u **Tablici 9.** te **Slici 11.**  $K_i$  vrijednosti 2-PAM gotovo su jednake za oba enzima. HI-6 također ima gotovo jednake  $K_i$  vrijednosti za oba enzima, ali te su vrijednosti oko 4 puta manje od onih određenih za 2-PAM oksim. Za razliku od prethodna dva oksima,  $K_i$  vrijednosti obidoksima značajno se razlikuju za hAChE<sub>erc</sub> i mAChE<sub>rec</sub>. U slučaju dva neutralna oksima, MINA i DAM, nije bilo moguće odrediti  $K_i$  vrijednosti za hAChE<sub>erc</sub> u testiranom rasponu koncentracija do 5 mmol dm<sup>-3</sup> što govori o jako slabom afinitetu hAChE<sub>erc</sub> za navedene neutralne oksime.

Određene  $K_i$  vrijednosti za JR595 oksim (**Tablica 10.**) za hAChE<sub>erc</sub> i mAChE<sub>rec</sub> iznosile su redom 365 i 273 μmol dm<sup>-3</sup>, što pokazuje nešto veći afinitet mAChE prema ovom neutralnom oksimu u odnosu na hAChE<sub>erc</sub>. U radu Zorbaz i sur. (2018), u kojem je korišten oksim JR595 topiv u organskom otapalu DMSO, određena je konstanta inhibicije za hAChE<sub>erc</sub> koja je iznosila 135 μmol dm<sup>-3</sup>. Budući da je u ovom radu korištena trifluorooctena sol JR595 oksima topiva u vodi, razlika u konstantama određenim u ovom diplomskom radu i navedenom znanstvenom radu vjerojatno je posljedica dodatnog utjecaja DMSO-a na enzimsku aktivnost (Kumar i Darreh-Shori, 2017). Kako bi se to dodatno ispitalo, JR595 topiv u vodi testiran je dodatno i na rekombinantnom ljudskom enzimu hAChE<sub>rec</sub>. Određena  $K_i$  za hAChE<sub>rec</sub> 326 μmol dm<sup>-3</sup> bliska je vrijednosti utvrđenoj za eritrocitni enzim hAChE<sub>erc</sub> što potvrđuje hipotezu da topivost spoja i utjecaj otapala na AChE aktivnost mogu utjecati i na određivanje konstanti inhibicije. Grafovi prema Hunter-Downsovom modelu za reverzibilnu inhibiciju triju različitih AChE enzima s oksimom JR595 prikazani su na **Slici 12.**

U usporedbi s  $K_i$  vrijednostima standardnih oksima za hAChE<sub>erc</sub> i mAChE<sub>rec</sub>, JR595 ima nešto veću  $K_i$  vrijednost za iste enzime (**Tablica 9.** i **10.**) odnosno manji afinitet vezanja od standardnih oksima. To je očekivano s obzirom na nedostatak kvaternog dušika i naboja kojim se ostvaruju povoljne nekovalentne interakcije vezanja.

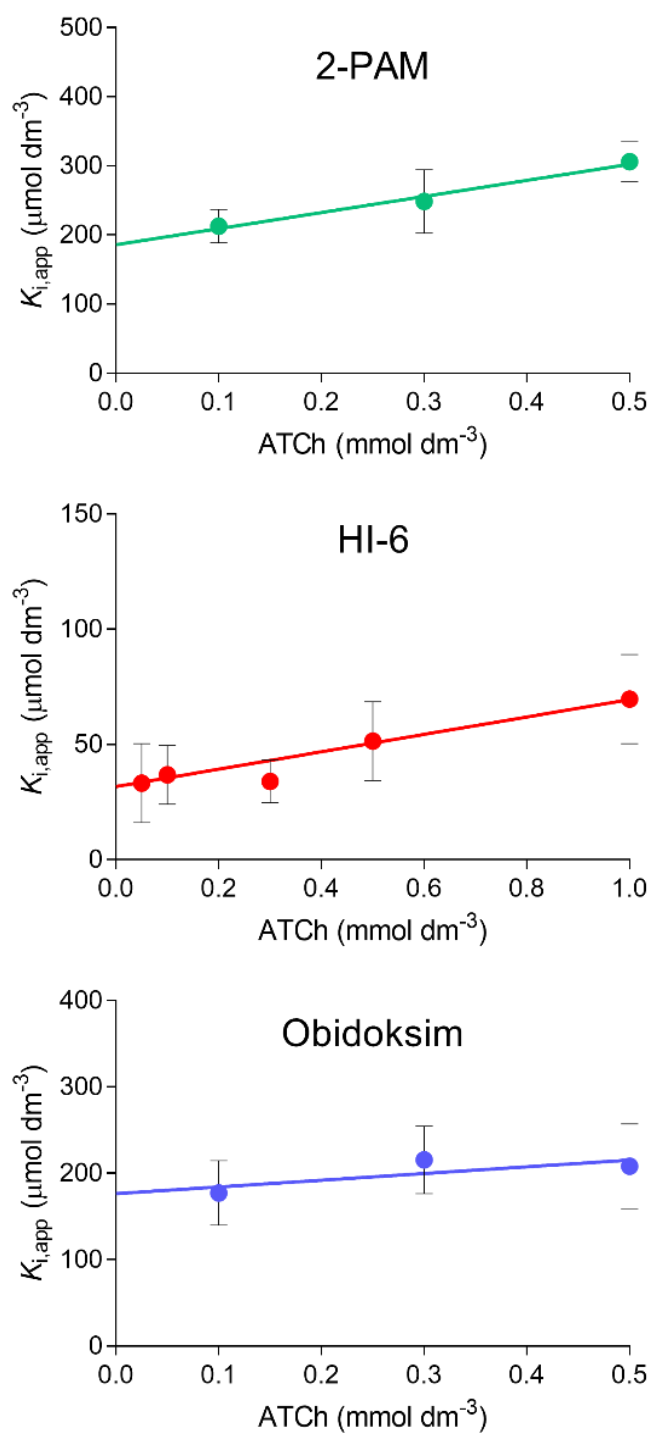
**Tablica 9.** Konstanta vezanja oksim-enzim,  $K_i$ , određena za komplekse mišje ili ljudske AChE sa standardnim ili neutralnim oksimima

|                   | $K_i$ ( $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ) |                       |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------|
|                   | hAChE <sub>Erc</sub>              | mAChE <sub>rec</sub>  |
| standardni oksimi |                                   |                       |
| 2-PAM             | 186 ± 17                          | 150 ± 10 <sup>1</sup> |
| HI-6              | 32 ± 4                            | 42 ± 9 <sup>2</sup>   |
| obidoksim         | 176 ± 17                          | 81 ± 21               |
| neutralni oksimi  |                                   |                       |
| MINA              | >5000                             | -                     |
| DAM               | >5000                             | -                     |

<sup>1</sup> Podaci iz ref. Katalinić i sur. 2018.; <sup>2</sup> Podaci iz ref. Kovarik i sur. 2006.

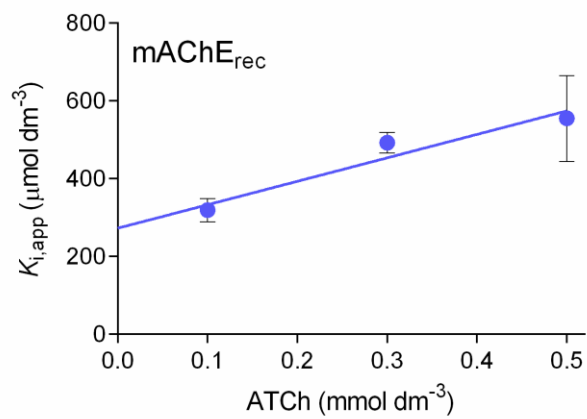
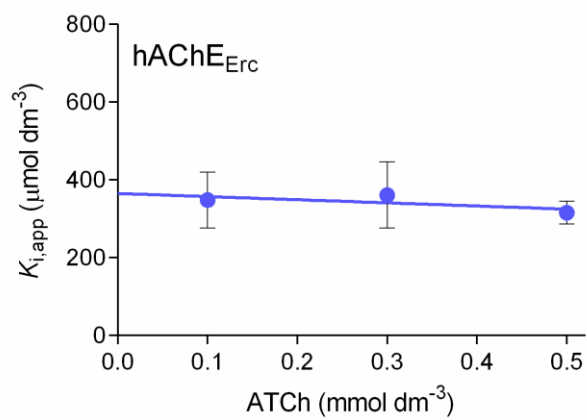
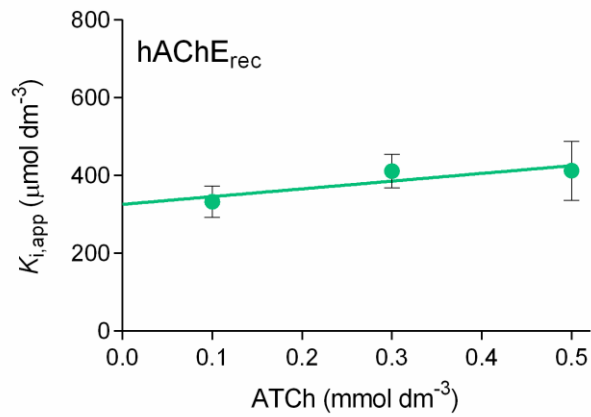
**Tablica 10.** Usporedba konstanti inhibicije,  $K_i$ , dobivenih za komplekse oksima JR595 sa trima različitim enzimima: rekombinantne ljudske (hAChE<sub>rec</sub>) i eritrocitna ljudska (hAChE<sub>Erc</sub>) i rekombinantna mišja (mAChE<sub>rec</sub>) acetilkolinesteraza.

|                      | $K_i$ ( $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ) |
|----------------------|-----------------------------------|
| hAChE <sub>rec</sub> | 326 ± 20                          |
| hAChE <sub>Erc</sub> | 365 ± 24                          |
| mAChE <sub>rec</sub> | 273 ± 33                          |



**Slika 11.** Grafički prikaz ovisnosti prividnih konstanti inhibicije  $K_{i,app}$  o koncentraciji supstrata ATCh određenih za inhibiciju hAChE<sub>Erc</sub> sa standardnim oksimima 2-PAM, HI-6 i obidoksim (po Hunter-Downsovom modelu).



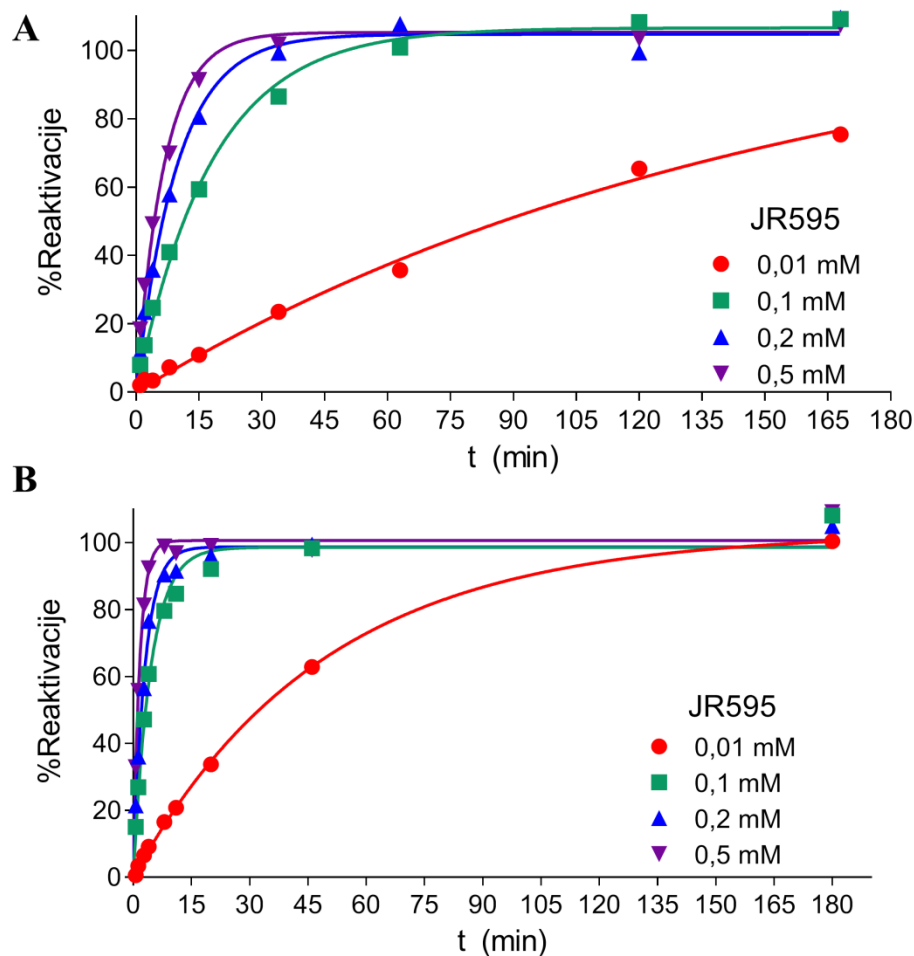


**Slika 12.** Grafički prikaz ovisnosti prividnih konstanti inhibicije  $K_{i,app}$  o koncentraciji supstrata ATCh određenih za inhibiciju eritrocitne ljudske hAChE<sub>Erc</sub> i rekombinantne ljudske hAChE<sub>rec</sub> te mišje mAChE<sub>rec</sub> sa oksimom JR595 (po Hunter-Downsovom modelu).

### 4.2.3. Reaktivacija mAChE inhibirane sarinom i VX-om pomoću JR595

Potencijal oksima JR595 da reaktivira mAChE inhibiranu sarinom i VX-om testiran je određivanjem povratka aktivnosti enzima pri  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  ATCh s različitim koncentracijama oksima kroz tri sata. Pritom su određeni reaktivacijski parametri: maksimalna konstanta brzine reaktivacije prvog reda,  $k_{+2}$ , disocijacijska konstanta reverzibilnog kompleksa inhibiranog enzima i oksima,  $K_{OX}$  te ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda,  $k_r$  (**Tablica 11.**). Reaktivacija mAChE inhibirane VX-om sa JR595 pokazuje četverostruko veći  $k_{+2}$  nego u slučaju reaktivacije mAChE inhibirane sarinom. To u kombinaciji sa sličnom disocijacijskom konstantom rezultira višom ukupnom konstantom reaktivacije  $k_r$  ( $3280 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) u slučaju reaktivacije VX-mAChE nego sarin-mAChE ( $1030 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ). **Slika 13.** pokazuje reprezentativni pokus reaktivacije na kojem se može primijetiti da brzina postizanja maksimalne reaktivacije ovisi o koncentraciji oksima odnosno s najvišom koncentracijom JR595 postiže se 100%-tna reaktivacija u najkraćem vremenu. Važno je istaknuti da pri koncentraciji od  $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$  JR595 također dovodi do potpune reaktivacije u zadovoljavajućem vremenu.

Usporedba reaktivacije mAChE i ljudske inačice enzima inhibiranih sa sarinom i VX-om (**Tablica 12.**; preuzeto iz Zorbaz i sur. 2018) pokazuje da nema značajnih razlika u konstantama reaktivacije kada se uzme u obzir i njihova standardna pogreška. Iz obje ove tablice je vidljivo da učinkovitost JR595 u reaktivaciji AChE, iako ovisi o afinitetu vezanja ( $1/K_{OX}$ ), prvenstveno ovisi o njegovoj nukleofilnosti i potencijalu za reaktivaciju ( $k_{+2}$ ), a oba ova parametra ovise o strukturi konjugiranog dijela OP spoja na katalitičkom serinu. Drugim riječima oksim JR595 je bolji reaktivator VX-om inhibirane AChE bez obzira na izvor enzima. Štoviše, ovi rezultati pokazuju da *in vitro* model miša kod terapije trovanja OP-ovima dobro opisuje model čovjeka.



**Slika 13.** Primjer pokusa ovisnost povratka aktivnosti (%Reaktivacije) mAChE inhibirane sarinom (A) i VX-om (B) o vremenu reaktivacije (t) sa oksimom JR595 ( $10\text{--}500\text{ mmol dm}^{-3}$ ).

**Tablica 11.** Parametri koji opisuju reaktivaciju mAChE inhibirane sarinom ili VX-om pomoću oksima JR595 ( $10\text{--}1000\text{ mmol dm}^{-3}$ ): maksimalna konstanta brzine reaktivacije,  $k_{+2}$ , konstanta vezanja inhibiranog enzima i oksima,  $K_{OX}$ , ukupna konstanta reaktivacije,  $k_r$ . Određeno iz dva pokusa reaktivacije.

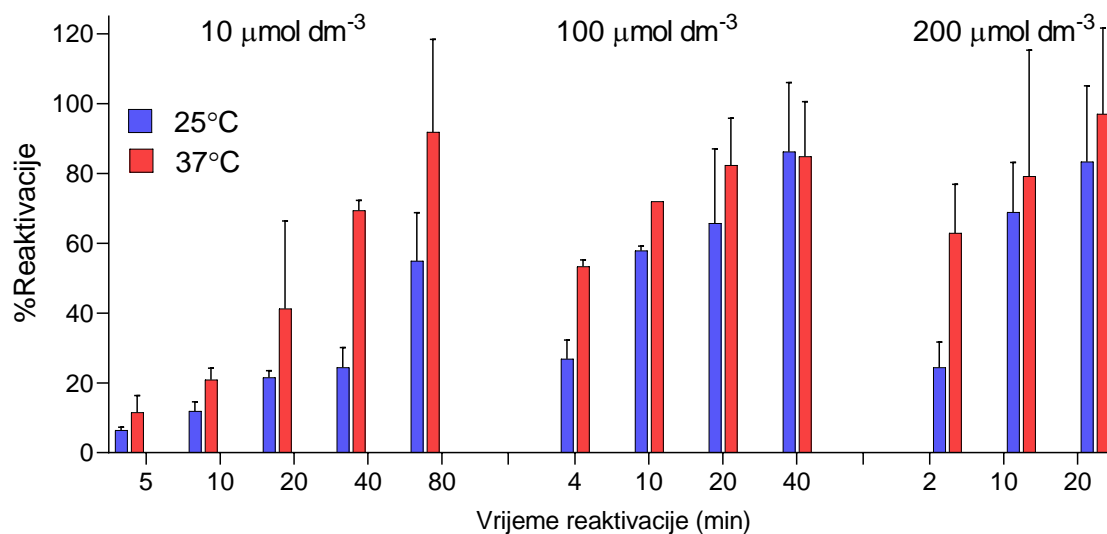
| Reaktivacijski parametar                        | mAChE           |                 |
|---|-----------------|-----------------|
|   | sarin           | VX              |
| $k_{+2}$ ( $\text{min}^{-1}$ )                  | $0,18 \pm 0,02$ | $0,77 \pm 0,16$ |
| $K_{OX}$ ( $\mu\text{mol dm}^{-3}$ )            | $175 \pm 57$    | $235 \pm 140$   |
| $k_r$ ( $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ) | $1030 \pm 240$  | $3280 \pm 1370$ |

**Tablica 12.** Parametri koji opisuju reaktivaciju hAChE inhibirane sarinom ili VX-om pomoću oksima JR595 ( $10\text{-}1000\text{mmol dm}^{-3}$ ) objavljeni u radu Zorbaz i sur. 2018.

| Reaktivacijski parametar                        | hAChE           |                 |
|---|-----------------|-----------------|
|   | sarin           | VX              |
| $k_{+2}$ ( $\text{min}^{-1}$ )                  | $0,29 \pm 0,03$ | $0,68 \pm 0,07$ |
| $K_{OX}$ ( $\mu\text{mol dm}^{-3}$ )            | $270 \pm 90$    | $300 \pm 60$    |
| $k_r$ ( $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ) | $1080 \pm 290$  | $2270 \pm 240$  |

#### 4.2.4. Utjecaj temperature na reaktivacijski potencijal JR595

Kako bismo procijenili kako bi se brzina reaktivacije s oksimom JR595 mogla razlikovati od *in vitro* određene brzine reaktivacija na  $25^\circ\text{C}$ , reaktivacijska smjesa inkubirana je na  $37^\circ\text{C}$ . Testirana je brzina reaktivacije s tri koncentracije JR595 oksima: 10, 100 i  $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Postignute reaktivacije između dviju temperatura uspoređene su u nekoliko vremenskih točaka prikazanih na **Slici 14**. Najniža koncentracija JR595 zahtijeva najdulji vremenski period do visokog stupnja reaktivacije (90-100%) inhibiranog enzima te je u vremenu od 80 minuta ostvaren samo pri uvjetu od  $37^\circ\text{C}$  (fiziološka temperatura). Potpuna reaktivacija (100%) u najkraćem vremenskom periodu ostvarena je s najvećom koncentracijom oksima pri oba temperaturna uvjeta. Iz grafičkog prikaza možemo zaključiti da pri sve tri koncentracije, u ranijim vremenskim točkama, JR595 molekula postiže veći postotak reaktivacije pri fiziološkoj temperaturi nego pri sobnoj temperaturi.



**Slika 14.** Usporedba ostvarenog postotka reaktivacije mAChE inhibirane sarinom naznačenim vremenima pri sobnoj (25 °C) i fiziološkoj (37°C) temperaturi, a s tri različite koncentracije oksima JR595 (10, 100 i 200 µmol dm<sup>-3</sup>).

Dodatno su uspoređena vremena potrebna za postizanje maksimalne reaktivacije (**Tablica 13.**) iz kojih se vidi da je reaktivacija mAChE-sarin sa JR595 oksimom pri 37°C ranije dostiže maksimalnu reaktivaciju nego pri 25°C. Navedeno potvrđuje da je brzina postizanja maksimalne reaktivacije veća pri temperaturi od 37°C nego od 25°C, ali vrijednosti maksimalne reaktivacije se ne razlikuju značajno između dviju temperatura (podaci nisu prikazani).

**Tablica 13.** Vremena potrebna za postizanje maksimalne reaktivacije mAChE inhibirane sarinom koristeći tri različite koncentracije JR595 oksima (10, 100, 200 µmol dm<sup>-3</sup>) i pri temperaturama 25 °C i 37 °C.

|                                | 25°C                          | 37 °C |
|--------------------------------|-------------------------------|-------|
| JR595 (µmol dm <sup>-3</sup> ) | <i>t</i> <sub>max</sub> (min) |       |
| 10                             | 180                           | 80    |
| 100                            | 40                            | 15    |
| 200                            | 20                            | 8     |

## 5. DISKUSIJA

---

Analiza farmakokinetike i farmakodinamike učinkovitog reaktivatora AChE vrlo je važna u pogledu razvoja novih ili modificiranja trenutnih oksimskih antidota. *In vitro* ispitivanja reaktivacijskog učinka oksima hidroksipiridinske skupine pokazala su visoki reaktivacijski potencijal za ljudsku hAChE u prijašnjoj studiji. S obzirom da ova skupina oksima nema stalni naboj, prolaze kroz KMB u dovoljnoj mjeri da pokažu bolju reaktivaciju u mozgu nego standardni oksimi (Zorbaz i sur. 2018). Dodatne analize metaboličke stabilnosti i citotoksičnog potencijala istaknule su oksim JR595 kao najboljeg kandidata za daljnja *in vivo* ispitivanja na mišu (Zorbaz i sur. 2020). Stoga je u ovom radu cilj bio usporediti *in silico* procjene farmakokinetičkih karakteristika oksima JR595 i njegovog farmakokinetičkog profila dobivenog na modelu miša dostupnog u literaturi (Zorbaz i sur. 2020), usporediti njegove kinetičke parametre *in vitro* analizom ljudske i mišje AChE inhibirane sarinom i VX-om te opisati mogući utjecaj razlike u temperaturi (sobna vs. fiziološka) na *in vitro* rezultate.

Za primarnu usporedbu mišje i ljudske AChE određena je pS krivulja ovisnosti enzimske aktivnosti o supstratu ATCh te reverzibilna inhibicija enzima s JR595, standardnim i odabranim oksimima. Standardni oksimi pripadaju skupini mono i bis-piridinijevih oksima, dok odabrani oksimi nemaju stalni naboj u svojoj strukturi kao i oksim JR595. JR595 pripada skupini hidroksipiridinskih oksima koji nemaju kvaterni dušikov atom unutar piridinskog prstena, već ugljikov atom vezan za položaj 6 piridinskog prstena čime je izbjegnuta stalna pozitivna naboj molekule. Također, visoka hidrofilnost, niski potencijal prolaska kroz KMB i slabo ili nikakvo djelovanje standardnih oksima na SŽS naveli su na razvoj novih neutralnih oksima s boljim potencijalom djelovanja u SŽS.

Pokusima enzimske kinetike određene su aktivnosti ljudske AChE i mišje AChE u ovisnosti koncentracije supstrata ATCh. Ova krivulja opisuje obrnutu parabolu za oba enzima potvrđujući od ranije poznat fenomen inhibicije aktivnosti supstratom  $K_M$ . Vrijednost  $mAChE_{rec}$  od  $0,058 \text{ mmol dm}^{-3}$  ukazala je na veći afinitet prema korištenom supstratu od  $hAChE_{erc}$  ( $K_M = 0,079 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Međutim, vrijednosti Michaelis-Mentenine konstante i njezine standardne pogreške te profil pS krivulja navode na zaključak da nema bitne razlike u kinetici ovog enzima iz dvije specije koji bi trebali utjecati na mehanizam reverzibilne inhibicije ili reaktivacije enzima oksimom. Slično je pokazano pokusima reverzibilne inhibicije određivanjem konstanti inhibicije za standardne oksime (2-PAM, HI-6,

obidoksim) i neutralne oksime (DAM, MINA, JR595), odnosno afiniteta enzima za vezanje pojedinog oksima. Iako se očekuje da se konstante koje opisuju te interakcije razlikuju, one ne bi trebale biti bitno različite. To je potvrđeno u pokusima reverzibilne inhibicije određivanjem disocijacijske konstante,  $K_i$ , za standardne (2-PAM, HI-6 i obidoksim) i neutralne oksime (DAM, MINA, JR595). Ova konstanta opisuje afinitet vezanja enzima prema pojedinom oksimu i mjera je inhibicije enzima samim oksimom. Dok  $K_i$  vrijednosti 2-PAM i HI-6 pokazuju da se njihovi afiniteti gotovo ne mijenjaju prema mAChE i hAChE, afinitet obidoksima otprilike je dva puta veći za mAChE u usporedbi s hAChE. Uspoređujući  $K_i$  vrijednosti za tri analizirana standardna oksima možemo zaključiti da HI-6 ( $K_i = 32 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ;  $K_i = 42 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) ima oko pet puta veći afinitet od 2-PAM i obidoksima prema obe acetilkolinesteraze. Neutralni oksim JR595 sa  $K_i$  vrijednosti od  $326 \mu\text{mol dm}^{-3}$  prema hAChE<sub>ErC</sub> pokazuje značajno manji afinitet od tri korištena standardna oksima. Iako veliki afinitet enzima za oksim možda izgleda kao nedostatak za primjenu oksima kao reaktivatora AChE inhibirane OP-om, barem *in vitro* (Čalić i sur. 2006), smatra se da koncentracije oksima koje se mogu postići *in vivo* ne mogu značajno utjecati na aktivnost enzima. *In vitro* određene ukupne konstante reaktivacije ( $k_r$ ) OP-mAChE i OP-hAChE konjugata s oksimom JR595 nisu pokazale značajne razlike pa se može utvrditi da *in vitro* model miša kod terapije trovanja OP -ovima dobro opisuje model čovjeka. Analizom utjecaja temperature na brzinu reaktivacije, vrijednosti pokazuju da su sve tri ispitane koncentracije JR595 pokazale oko dva puta kraći vremenski period (min) do postizanja maksimalne reaktivacije na višoj (fiziološkoj) temperaturi. Stoga se u *in vivo* može očekivati i brža reaktivacija.

Analizom molekularnih i osnovnih farmakokinetičkih svojstava uz upotrebu *Molecular Properties* i *ADMET Descriptors* protokola procijenjena je *in silico* farmakokinetike oksima JR595. Prema analizi molekularnih karakteristika, spoj JR595 ima većinu zadovoljavajućih karakteristika te je jedino PSA izvan preporučenih vrijednosti. Vjerojatnost slabijeg prolaska JR595 kroz KMB je kombinacija polarnosti molekule i ionizacija molekule pri fiziološkom pH. U literaturi je dostupan podatak o udjelu neutralnog oblika JR595 pri fiziološkom pH koji iznosi 30 %, što je također određeno koristeći *in silico* procjenu  $pK_a$  vrijednosti ionizirajućih skupina spoja (Zorbaz i sur, 2018). Međutim, to je najpovoljniji udio koji je ostvaren među pet predstavnika 3-hidroksi-2-piridniskih oksima.

Nadalje, procjenjuje se da bi spoj JR595 pokazao poželjnu apsorpciju iz crijeva u krv nakon oralne primjene, a tijekom distribucije manje od 90% spoja veže se na proteine plazme

što znači da dolazak spoja na željeno mjesto djelovanja neće biti značajno smanjen. Vrlo je bitno da je afinitet lijeka prema ciljanom receptoru ili enzimu veći od afiniteta prema proteinima plazme poput albumina (HSA prema engl. *human serum albumin*) kako bi se spriječilo stvaranje velikih zaliha vezanog lijeka u krvnoj plazmi (Krueger i sur. 1965; Benet i sur. 1996). HSA najbrojniji je protein krvne plazme te ima mogućnost vezanja raznovrsnih vrsta lijekova, a posebice veliki afinitet prema lipofilnim i negativno nabijenim molekulama (Goodman i Gilman 1996; Peters 1996). Interakcija lijekova u krvnoj plazmi uzrokovana plazmatskim proteinskim vezanjem predstavlja farmakokinetički mehanizam koji može rezultirati dislociranjem s proteinskog mjesta jednog od lijeka te posljedično uzrokovati toksičnost nastalu povećanom koncentracijom slobodnog lijeka u plazmi. Navedeni mehanizam važan je kontrolirati i za tretman oksimskim reaktivatorima s obzirom da se primjenjuju u kombinaciji s atropinom ili diazepamom. Kao primjer dislokacije s proteinskog veznog mjesta može se navesti varfarin (Coumadin<sup>TM</sup>) čije koncentracije u obliku slobodne molekule mogu biti nepoželjno povećane uzrokom interakcije s drugim lijekom u plazmi (Dubey i sur. 2017). Iako su prema ADMET\_BBB modelu analize oba oblika JR595, nabijeni i neutralni, klasificirana u skupinu lijekova s niskim potencijalom prolaska kroz KMB nakon oralne primjene (koncentracija u mozgu iznosi do 30% koncentracije u krvi), takav prolazak bi i dalje bio bolji nego što postižu standardni oksimi (Kalasz i sur. 2015). U literaturi (Zorbaz i sur. 2020) je pokazano da koncentracija JR595 u mozgu miševa nakon intramuskularne primjene iznosi do 40% koncentracije u krvi, što je blisko *in silico* procijenjenoj vrijednosti. Koristeći predikcijske elipse za modele ADMET\_Apsorbition i ADMET\_BBB level možemo zaključiti da neutralni oblik JR595 zbog veće lipofilnosti (AlogP98) ima povoljniji položaj unutar sve četiri elipse, tj. pokazuje bolju apsorpciju i prodor kroz KMB. Očekivano, neutralnost oksima poželjnija je od njegove nabijenosti. Polarnost molekule približno je jednaka za oba oblika JR595 te promjena naboja iste molekule ne rješava potencijalni problem visoke PSA.

Usporedba vrijednosti logD pri pH 7,4 (1,447) dobivene *in silico* analizom JR595 sa vrijednosti Chrom logD (1,41) određene eksperimentalno (Zorbaz i sur. 2020) pokazuje dobro slaganje. Iako povećana lipofilnost spoja može povećati njegov potencijal vezanja za CYP enzime i time uzrokuje metaboličku razgradnju (Lewis i sur. 2004), pokazano je da ne dolazi do značajnog razgrađivanja JR595 s ljudskim ili mišjim CYP enzimima. Farmakokinetički profil JR595 određen je nakon *i.m.* primjene 100 mg/kg na modelu miša iz čega su određene koncentracije spoja u krvi i mozgu (Zorbaz i sur. 2020). Kompatibilno



sa vrijednostima *in silico* analize, spoj je pokazao brzu apsorpciju te je maksimalna koncentracija u krvi izmjerena u periodu od 15min nakon primjene ( $t_{\max} = 15$  min). Maksimalna koncentracija u krvi iznosila je  $\sim 140 \mu\text{M}$ . Međutim, na modelu miša je utvrđena i brza eliminacija, koja vjerojatno nije posredovana metaboličkom razgradnjom CYP enzimima. Razlika u brzini metabolizma i eliminacije između glodavaca i većih sisavaca treba se uzeti u obzir prilikom analize farmakološkog profila JR595 dobivenog *in vivo* pokusom na modelu miša. Na primjeru antibiotika, poluvrijeme života primjenjenog spoja 6-9 puta je duže kod čovjeka nego kod glodavaca, uglavnom zbog brže renalne eliminacije glodavaca (Andes i Craig 2002). Kada bi se isto dogodilo u slučaju oksima JR595 on bi u organizmu čovjeka ostvario dulje vrijeme cirkulacije u krvi. Brza eliminacije spoja kod modela miša smanjuje učinkovitost lijeka prema ciljanome mjestu te primjenom jednake koncetracije JR595 na model čovjeka možemo očekivati bolji antidotski potencijal nego što je pokazano na modelu miša gdje je glavni nedostatak pri terapiji miševa otrovanih VX-om ili sarinom bila brza eliminacija JR595 iz cirkulacije (Zorbaz i sur. 2020).

## 6. ZAKLJUČAK

---

- Analizom rezultata reaktivacijskih parametara u *in vitro* uvjetima te *in silico* analizom fizikalno-kemijskih i farmakoloških karakteristika neutralnog oksima JR595, očekuje se pogodan prolazak spoja kroz KMB te bolji reaktivacijski potencijal u mozgu u odnosu na trenutno korištene standardne oksime.
- ADMET profil neutralnog oblika (0) JR595 prikazan statističkim modelom predikcijskih elipsa očekivano se pokazao se povoljnijim od ADMET profila nabijenog (+1) oblika JR595 zbog poželjnije lipofilnosti spoja koja pogoduje boljoj gastrointestinalnoj apsorpciji te boljem prolasku kroz KMB.
- Dodatnim ispitivanjem utjecaja povišenja temperature sa sobne (25°C) na fiziološku (37°C) na reaktivacijski potencijal JR595 u slučaju mAChE inhibirane sarinom potvrđena je veća brzina postizanja maksimalne reaktivacije pri temperaturi od 37°C.
- *In vitro* određene katalitičke konstante enzima, konstante inhibicije s oksimom te ukupne konstante brzine reaktivacije OP-mAChE i OP-hAChE konjugata s oksimom JR595 nisu pokazale značajne razlike pa se može utvrditi da *in vitro* model miša kod terapije trovanja OP-ovima dobro opisuje model čovjeka.

## 7. LITERATURNI IZVORI

---

Aird W.C (2007): Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation Research* **100**: 158–173.

Aird W.C (2007): Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circulation Research* **100**: 174–190.

Aldridge A. N. (1950): Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl pnitrophenyl thiophosphate and analogs (E605). *Biochemical Journal* **46**: 451-460.

Allen L., MacKichan J., Ritschel W.A. (1982): Manual of symbols, equations and definitions in pharmacokinetics. *The Journal of Clinical Pharmacology* **22**:1–23.

Altamirano C.V., Lockridge O. (1999): Conserved aromatic residues of the C-terminus of human butyrylcholinesterase mediate the association of tetramers. *Biochemistry* **38**:13414–13422.

Andes D., Craig W.A. (2002): Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: A critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents* **19**(4):261-8.

Aragao I., Soares M.E., Bastos M.L., Lopes M. (1996): Continuous infusion of obidoxime and the importance of plasma levels monitoring in organophosphate poisoning. *Intensive Care Medicine* **22**(3): 388.

Atkinson F., Cole S., Green C., Waterbeemd H.V.D. (2002): Lipophilicity and other parameters affecting brain penetration. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents* **2**:229–240.

Bajgar J., Fusek J., Kuca K., Bartosova L., Jun D. (2007): Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: Facts and fiction. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* (7):461–466.

Bajgar, J. (2004): Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Advances in Clinical Chemistry* **38**:151.

Benet L.Z., Kroetz D.L., Sheiner L.B., Pharmacokinetics. The dynamics of drug absorption distribution and elimination (1996): U: Goodman G.A., Gilman (ur.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York, McGraw-Hill, str. 3–27.

Benschop H. P., De Jong L. P. A. (1998): Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation and toxicology. *Accounts of Chemical Research* **21**:368.

Bentur Y., Layish I., Krivoy A. (2006). Civilian adult self injections of atropine-trimedoxime (TMB4) auto-injectors. *Clinical Toxicology* **44**:301–6.

- Bismuth C., Inns R. H., Marrs, T. C. (1992): Efficacy, toxicity and clinical use of oximes in anticholinesterase poisoning. U: B. Ballantyne i T. C. Marrs (ur.) *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Oxford, Butterworth–Heinemann, str. 555–577.
- Blong R.M., Bedows E., Lockridge O. (1997): Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. *Biochemical Journal* **327** (3):747–757.
- Bosak A., Katalinić M., Kovarik Z. (2011): Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **62**(2):175–189.
- Bourne Y., Taylor P., Marchot P. (1995): Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex. *Cell* **83**:503–512.
- Cannard K. (2006): The acute treatment of nerve agent exposure. *Journal of Neuroscience* **249**(1): 86–94.
- Carullo P., Cetrangolo G.P., Mandrich L., Manco G., Febbraio F (2015): Fluorescence spectroscopy approaches for the development of a real-time organophosphate detection system using an enzymatic sensors **15**(2): 3932–3951.
- Cheng Y.H, Cheng X.L, Radić Z., McCammon J.A. (2007): Acetylcholinesterase: mechanisms of covalent inhibition of H447I mutant determined by computational analyses. *Journal of the American Chemical Society* **129**:6562–6570.
- Childs A.F., Davies D.R., Green A.L., Rutland J.P. (1955): The reactivation by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organo-phosphorus compounds. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* **10**:462–465.
- Clement J.G. (1982): HI-6: reactivation of central and peripheral acetylcholinesterase following inhibition by soman, sarin and tabun in vivo in the rat. *Biochemical Pharmacology* **31**:1283.
- Cokugras (2003): Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turkish Journal of Biochemistry* **28**:54-61.
- Costa L.G., Toby B.C., Vitalone A., Furlong C.E. (2005): Measurements of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clinica Chimica Acta* **352**:37-47.
- Čalić M., Kovarik Z. (2006): In vitro interactions between pyridinium aldoximes and endogenous bio-scavenger butyrylcholinesterase in tabun poisoning. *Toxicology* **233**(1):237-238.
- Daneman R.(2012): The blood–brain barrier in health and disease. *Annals of Neurology* **72**: 648–672.
- Darvesh S., Hopkins D.A., Guela C. (2003): The biology of butyrylcholinesterase. *Nature reviews Neuroscience* **4**(2): 131-8

Dubey R.K., Leeners B., Imthurn B., Merki-Feld G.S., Rosselli M. (2017): Piperine decreases binding of drugs to human plasma and increases uptake by brain microvascular endothelial cells. *Phytotherapy Research* **31**(12):1868–1874.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. jr., Featherstone R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**(2):88-90.

Erdmann W.D., von Clarmann M. (1963): Ein neuer Esterase-Reaktivator für die Behandlung von Vergiftungen mit Alkylphosphaten. *The Deutsche Medizinische Wochenschrift* **88**:2201–6.

Froede H.C., Wilson I.B. (1971): Acetylcholinesterase. U: Boyer P.D. (ur.) *The Enzymes*. New York, Academic Press, str.87–114.

Goodman G.A., Gilman (1996): *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York.

Gupta R. (2015): *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Elsevier.

Gupta R. (2005): *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Amsterdam, Academic Press/Elsevier.

Harel M., Schalk I., Ehret-Sabatier L., Bouet F., Goeldner M., Hirth C., Axelsen P.H., Silman I., Sussman J.L. (1993): Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:9031–9035.

Harel M., Sussman J.L., Krejci E., Bon S., Chanal P., Massoulie J., Silman I. (1992): Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(22):10827-31.

Harel M., Quinn D.M., Nair H.K., Silman I., Sussman J.L. (1996): The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *Journal of the American Chemical Society* **118**:2340–2346.

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](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf).

Jeong H.C., Kang N.S., Park N.J., Yum E.K., Jung Y.S.(2009): Reactivation potency of fluorinated pyridinium oximes for acetylcholinesterases inhibited by paraoxon organophosphorus agent. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **19**:1214–1217.

Kalász H., Nurulain S.M., Veress G., Antus S., Darvas F., Adeghate E., Adem A., Hashemi F., Tekes L. (2015): Mini review on blood-brain barrier penetration of pyridinium aldoximes. *Journal of Applied Toxicology* **35**:116–123.

- Kassa J. J. (2002): Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *Clinical Toxicology* **6**:803.
- Kovarik Z., Bosak A., Šikno G., Latas T. (2003): Exploring the active sites of cholinesterases by inhibition with bambuterol and haloxon. *Croatica Chemica Acta* **76**:63-67.
- Krueger-Thiemer E., Buenger P., (1965): The role of the therapeutic regimen in dosage design. *Chemotherapia* **10**:61–73.
- Kuča K., Cabal J., Jun D., Kassa J., Bartošová L., Kunešová G., Dohnal V. (2005): Strategy for the development of new acetylcholinesterase reactivators - antidotes used for treatment of nerve agent poisonings. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **149**(2):429-431.
- Kuča K., Jun D., Bajgar J. (2007): Currently used cholinesterase reactivators against nerve agent intoxication: comparison of their effectivity in vitro. *Drug and Chemical Toxicology* **30**(1):30-31.
- Kumar A., Darreh-Shori T. (2017). DMSO: A mixed-competitive inhibitor of human acetylcholinesterase. *ACS Chemical Neuroscience* **8**:2618–2625.
- Kusić R., Bosković B., Vojvodić V. (1985): HI-6 in man: blood levels, urinary excretion and tolerance after intramuscular administration of the oxime to healthy volunteers. *Fundamental and Applied Toxicology* **5**:89-97.
- Lattera J., Keep, R., Betz, A.L., Goldstein, G.W. (1999): U: Siegel G.J. (ur.) *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, str. 672-689.
- Levin V.A. (1980): Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *Journal of Medicinal Chemistry* **23**:682–684.
- Lewis D.F.V., Jacobs M.N., Dickins M. (2004): Compound lipophilicity for substrate binding to human P450s in drug metabolism. *Drug Discovery Today* **9**:530–537.
- Lin Q., Liang R., Williams P.A. (2017): Factors affecting bioaccessibility of  $\beta$ -caroten lipid-based microcapsules: digestive conditions, the composition, structure and physical state of microcapsules. *Food Hydrocolloids* **77**:187-203.
- López-Muñoz F., Alamo C., Guerra J.A., García-García P. (2008): The development of neurotoxic agents as chemical weapons during the National Socialist period in Germany *Revue Neurologique* **47**(2):99-106.
- Lüttringhaus A., Hagedorn I. (1964): Quartäre Hydroxyiminomethyl-pyridiniumsalze: das Dichlorid des Bis-[4-hydroxyiminomethyl-pyridinium-(1)-methyl]-äthers ('LüH6'), ein neuer Reaktivator der durch organische Phosphorsäureester gehemmten Acetylcholinesterase. *Arzneimittel Forschung* **14**:1–5.

- Marrs, T.C. (2007): Toxicology of organophosphate nerve agents. U: Marrs, T.C., Maynard R.L., Sidell F.R., (ur.) Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment, Chichester, John Wiley and Sons Ltd., str.191-221.
- McDonough J. H., Shih T.M. (2007): Atropine and other anticholinergic drugs. U: Marrs T. C., Maynard R. L., Sidell F. R. (ur.) Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment West Sussex, John Wiley and Sons Ltd, str. 287-303.
- McDonough J.H., Shih T.M. (1997): Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **21**(5):559-579.
- Mitragotri S., Burke P.A., Langer R. (2014): Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nature Reviews Drug Discovery* **13**(9):655-72.
- Moore D.H., Hayward I.J., Tucker F.S., Lukey B. (1991): HI-6 and 2-PAM in sheep: pharmacokinetics and effects on muscle tissue following intramuscular injection. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* **3**:223-232
- Moretto A. (1998): Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agents. *Toxicology Letters* **102-103**:509-513.
- Nachmansohn D., Rothenberg M.A. (1945): Studies on cholinesterase: I. On the specificity of the enzyme in nerve tissue. *The Journal of Biological Chemistry* **158**:653-666.
- Pajouhesh H., Lenz, G.R (2005): Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx* **2**:541-553.
- Peters Jr. T. (1996): All About Albumin: Biochemistry Genetics and Medical Applications. Academic Press, San Diego.
- Quinn D.M. (1987): Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews* **87**:955–979.
- Rosenberry T.L. (1975.): Acetylcholinesterase. U: Alton Meister (ur.) *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. New York, Wiley, str.103–218.
- Rosenberry T.L. (2010): Strategies to resolve the catalytic mechanism of acetylcholinesterase. *Journal of Molecular Science* **40**:32–39.
- Sánchez-López E., Espina M., Doktorovova S., Souto E.B., García M.L. (2017): Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part I – Barriers and determining factors in ocular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **110**:70-75.
- Shafferman A., Ordentlich A., Barak D., Stein D., Ariel N., Velan B. (1996): Aging of phosphorylated human acetylcholinesterase: catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre. *Biochemical Journal* **318**(3): 833–840.

- Sidell F.R. (1997): Nerve agents. U: Sidell F.R., Takafuji E.T., Franz D.R.(ur.) Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Washington D.C., Borden Institute, str. 129–179.
- Siepmann J., Sipemann F., Florence T.A. (2016): Factors influencing oral drug absorption and bioavailability. U: Florence T.A, Siepmann J.(ur.) Modern Pharmaceutics. CRC Press.
- Silman I., Sussman J.L. (2008): Acetylcholinesterase: how is structure related to function? *Chemico-Biological Interactions* **175**:3–10.
- Sims D.E. (1986): The pericyte—A review. *Tissue Cell* **18**:153–174.
- Somani, S.M., Solana, R.P., Dube, S.N. (1992): Toxicodynamics of nerve agents. U: Somani, S.M. (ur.) *Chemical Warfare Agents*. New York, Academic Press Inc., str. 68-123.
- Stojiljković M.P., Jokanović M. (2006): Pyridinium Oximes: Rationale for their selection as causal antidotes against organophosphate poisonings and current solutions for auto-injectors. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **57**(4):435-443.
- Stryer L. (1991): *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb.
- Stuart J.A., Ursano R.J., Fullerton C.S., Norwood A.E., Murray K. (2003): Belief in exposure to terrorist agents: Reported exposure to nerve or mustard gas by Gulf War veterans. *The Journal of Nervous and Mental Disease* **191**:431–6.
- Sussman J.L, Harel M., Frolov F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I. (1991): Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. **253**:872–879.
- Taylor P., Lappi S. (1975): Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry* **14**:1989–1997.
- Taylor P., Radić Z. (1994): The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **34**:281-320.
- Taylor P., Radić Z., Camp S., (2009): Acetylcholinesterase. U: Lary R. Squire (ur.) *Encyclopedia of Neuroscience*. San Diego, Academic Press/Elsevier, str. 5-7.
- Thiermann H., Eyer F., Felgenhauer N., Pfab R., Zilker T., Eyer P., Worek F. (2010): Pharmacokinetics of obidoxime in patients poisoned with organophosphorus compounds. *Toxicology Letters* **197**:236-242.
- Wilson I.B. (1959): Molecular complementarity and antidotes for alkylphosphate poisoning. *Federal Proceedings* **2**:752-8.
- Wilson I.B., Ginsburg S. (1955): A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta* **18**(1):168-70.



Wilson I.B., Quan C. (1958): Acetylcholinesterase: Studies on molecular complementarity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **73**:131–143.

Worek F., Koller M., Thiermann H. i sur. (2005): Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology* **214**:182-189.

Worek F., Thiermann H., Wille T. (2020): Organophosphorus compounds and oximes: a critical review. *Archives of Toxicology* **94**:2275–2292.

Zlokovic B.V. (2008): The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**:178–201.

Zorbaz T. (2018): Novi pristup analizi oksima dizajniranih za zaštitu središnjega živčanoga sustava pri trovanju organofosforinim spojevima. Doktorska disertacija. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet.

Zorbaz T., Braiki A., Maraković N., Renou J., de la Mora E., Maček Hrvat N., Katalinić M., Silman I., Sussman J.L., Mercey G., Gomez C., Mougeot R., Pérez B., Baati R., Nachon F., Weik M., Jean L., Kovarik Z., Renard P.Y. (2018): Potent 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime reactivators of organophosphate-inhibited cholinesterases with predicted blood–brain barrier penetration. *Chemistry-A European Journal* **24**(38):9675-9691.

Zorbaz T., Mišetić P., Probst N., Žunec S., Zandona A., Mendaš G., Micek V., Maček Hrvat N., Katalinić M., Braiki A., Jean L., Renard P.Y., Gabelica Marković V., Kovarik Z. (2020): Pharmacokinetic evaluation of brain penetrating morpholine-3-hydroxy-2-pyridine oxime as an antidote for nerve agent poisoning. *ACS Chemical Neuroscience* **11**(7):1072-1084.

# Životopis

---

## Osobni podaci

Ime: Kristian  
Prezime: Pavošević  
Datum rođenja: 08.10.1995.  
Adresa: Vatroslava Jagića 19  
Mobilni telefon: +385 99 834 8345  
E-mail: pavosevic.kristian10@gmail.com-  
Državljanstvo: hrvatsko

## Obrazovanje

2017.- 2021. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Biološki odsjek, Fiziologija i imunobiologija  
2014.-2017. Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

## Osobne vještine i kompetencije

Materinski jezik: hrvatski  
Strani jezici: engleski, njemački

| Razumijevanje |         | Govor               |                    | Pisanje |
|---------------|---------|---------------------|--------------------|---------|
| Slušanje      | Čitanje | Govorna interakcija | Govorna produkcija |         |
| C2            | C2      | C2                  | C2                 | C2      |
| B1            | B1      | A2                  | A2                 | B1      |

**Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik**

Informatičke vještine: R programiranje, Python, strojno učenje, MS Office

Postersko priopćenje:

Zorbaz, Tamara; Mišetić, Petra; Žunec, Suzana; Mendaš, Gordana; Micek, Vedran; Pavošević, Kristian; Gabelica Marković, Vesna; Jean, Ludovic; Renard, Pierre-Yves; Kovarik, Zrinka. Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of morpholine-3-hydroxy-2-pyridine oxime, centrally active antidote for nerve agent poisoning. Book of Abstracts of the Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology "Crossroads in Life Sciences", HDBMB2019, Lovran, Hrvatska, 2019, str. 135.