

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра за фармакологију и токсикологију

Мирослав Д. Марковић

**УТИЦАЈ НАТРИЈУМ БИКАРБОНАТА И СТАНДАРДНИХ
АНТИДОТА НА АЦИДО-БАЗНИ СТАТУС ПАЦОВА АКУТНО
ТРОВАНИХ МАЛАТИОНОМ**

- докторска дисертација -

КРАГУЈЕВАЦ 2012.

Изражавам неизмерну и безрезервну захвалност своме ментору Проф.Др Драгану Миловановићу на подршци и стручним саветима у току израде ове докторске дисертације

Посебно се захваљујем Управи Центра за контролу тровања Војномедицинске академије на челу са Проф.Др Славицом Вучинић као и бившем Начелнику Проф.Др Душану Јовановићу на указаном стручном и професионалном поверењу и могућности за успешну израду докторске дисертације

Такође велику захвалност изражавам Начелнику Института за токсикологију и фармакологију, Проф.Др Дубравку Бокоњићу на несебичној стручној помоћи и стручним саветима који су ми били од изузетног научног значаја и важности како при експерименталном раду тако и при писању докторске дисертације

Нарочито се захваљујем Проф.Др Богдану Бошковићу на свакодневној стручној помоћи, као и за моралну подршку током израде ове докторске дисертације

Захваљујем се Др Томиславу Режићу на несебичној стручној помоћи без које не би било ове дисертације као и свим члановима Одељења за експерименталну токсикологију и фармакологију који су на било који начин допринели успешној изради ове докторске дисертације

И на крају, захваљујем се својој породици која је поднела огромну жртву и уложила огромне напоре да ми омогући успешно завршавање докторских студија и израду докторске дисертације

Аутор

САДРЖАЈ

1. УВОД

1.1. Историјат развоја органофосфорних једињења	4
1.2. Токсиколошки значај ОФ једињења	5
1.2.1. Малатион	6
1.3. Механизам деловања ОФ једињења.....	9
1.4. Клиничка слика тровања ОФ једињењима	11
1.5. Терапија тровања органофосфорним једињењима	12
1.5.1. Атропин	12
1.5.2. Реактиватори холинестеразе (оксими).....	13
1.5.3. Антikonвулзиви	15
1.6. Перспективе терапије тровања ОФ једињењима.....	16
1.6.1. Натријум бикарбонат.....	16

2. РАДНА ХИПОТЕЗА	19
-------------------------	----

3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	20
-----------------------------	----

4. МЕТОДЕ РАДА	21
----------------------	----

4.1. Супстанце	21
4.2. Животиње	21
4.3. Акутна токсичност.....	22
4.3.1. Испитивање акутне токсичности малатиона.....	22
4.3.2. Испитивање заштитног ефекта натријум бикарбоната	22
4.3.3. Испитивање заштитног ефекта антидота	22
4.4. Гасне анализе артеријске крви пацова.....	22
4.5. Протоколи испитивања ацидо-базног статуса артеријске крви пацова	26
4.5.1. Испитивање ацидо-базног статуса после примене NaHCO_3	26
4.5.2. Испитивање ацидо-базног статуса после примене средње леталне дозе (1 LD_{50}) малатиона	26
4.5.3. Испитивање ацидо-базног статуса после комбиноване примене малатиона (1 LD_{50}) и NaHCO_3 (3 ммол/кг)	27
4.5.4. Испитивање утицаја различитих комбинација антидота на ацидо-базни статус крви пацова трованих апсолутно смртном дозом (1,3 LD_{50}) малатиона	27

4.6. Статистичка анализа.....	27
5. РЕЗУЛТАТИ	28
5.1. Токсиколошка дејства малатиона.....	
5.2. Утицај различитих доза натријум бикарбоната на гасне параметре крви пацова..	
5.3. Заштитни ефекти различитих доза натријум бикарбоната код тровања пацова малатионом (1,3 LD ₅₀).....	
5.4. Процена могућности корекције метаболичке ацидозе изазване 1 LD ₅₀ малатиона (po) применом натријум бикарбоната NaHCO ₃ (3 mmol/L ip.).....	
5.5. Утицај различитих антидотских третмана на гасне параметре крви пацова трованих апсолутно смртном дозом (1,3 LD ₅₀) малатиона, 24 сата после интоксикације.....	
5.6. Заштитни ефекти антидота примењених <i>per se</i> или у комбинацији са NaHCO ₃ у пацова третираних са апсолутно леталном дозом (1,3 LD ₅₀) малатиона.....	
6. ДИСКУСИЈА	54
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	67
8. ЛИТЕРАТУРА.....	69

1. УВОД

1.1. Историјат развоја органофосфорних једињења

Прво органско једињење фосфора, тетраетил пирофосфат (TEPP), синтетисано је давне 1854. године (Holmstedt, 1959; 1963). Године 1873. синтетисано је прво једињење са директно везаним атомом угљеника за атом фосфора. Посебан допринос дао је Lange, који је радећи на увођењу атома флуора у молекул органофосфата, успео да синтетизује већи број инсектицида и фунгицида. Његови резултати били су поверени немачком концерну хемијске индустрије "Interessen Gemeinschaft Farbenindustrie (I.G. FarbenIndustrie). Otto Bayer, који је био на челу истраживачког тима ове компаније у Леверкусену, поверио је 1934. године Герхарду Шрадеру да даље ради на синтези и испитивању читавог низа нових органофосфорних (ОФ) једињења.

Током наредних десет година, Шрадер је у "I.G. FarbenIndustrie" синтетисао око 2000 ОФ једињења. Иако су та истраживања првобитно започета у циљу добијања нових инсектицида, већ од 1935. године инсистирало је да Шрадер усмери своје истраживање ка открићу потенцијалних бојних отрова. Први од нервних бојних отрова (табун), синтетисан је 1936. године, а нешто касније синтетисан је и други нервни бојни отров сарин.

Истовремено са Шрадеровим истраживачким радом, али потпуно независно, британски научници такође су се бавили синтезом фосфонофлуоридата, инспирисани немачким предратним и јавно публикованим истраживањима. Тако су до 1940. године били и од стране британског тима синтетисани диметил фосфонофлуоридат и диетил фосфонофлуоридат. Почетком 1941. године McCombie i Saunders успевају да синтетизују диизопропил флуорофосфат (DFP). DFP је потом низ година био незаобилазна моделна супстанца у проучавању фармакодинамских и токсикодинамских дејстава инхибитора ацетилхолинестеразе. После Другог светског рата настављена су истраживања на синтези нових нервних бојних отрова, када су синтетисани нови трилони тзв. Г-serije (изопротил етилфосфоно флуоридат и циклохексил метилфосфоно флуоридат).

Нешто касније, у Великој Британији синтетисана је читава нова серија нервних бојних отрова, познатих под називом В-отрови или В-агенси. Међу њима је најпознатији VX-отров, синтетисан 1952. године, који је дуго година био у арсеналу најмоћнијих светских сила.

Поред несумњиве користи од употребе ОФ једињења у пољопривреди и комуналној хигијени, сведоци смо да нервни бојни отрови нису само део историје. Документовано је и потврђено да је Ирак у рату против Ирана применио табун, а касније и сарин.

Процењено је да је у ратном сукобу од бојних отрова страдало на хиљаде војника и цивила (Balali Mood i Shariat, 1998). У високо развијеној и технолошки савременој држави као што је Јапан десила су се четири терористичка напада нервним бојним отровима од стране фанатичне верске секте AUM Shinrikyo. У граду Matsumoto 1994. године, припадници секте су применили сарин, што је узроковало смрт 7 од укупно 600 отрованих људи (Yoshida, 1994; Morita i sar., 1995). Наредне године један грађанин Токија био је попрскан по леђима спрејом који је садржавао ВХ-отров (Nozaki i sar., 1995). Исте године у Токију се догодило масовно тровање 5000 људи сарином у подземној железници, уз 12 смртних исхода тровања (Nozaki i sar, 1995).

Тровање сарином се поновило 19. априла 1995. године у подземној железници у Јокохами, али тог пута ни један од 261 отрованих људи није подлегао (Masuda i sar., 1995; Nozaki i Aikawa, 1995). Ови инциденти јасно указују да поред великих и регионалних војних сила и поједине добро организоване групе, уз минималну расположиву опрему, могу да синтетизују и на одговарајући начин примене нервне бојне отрове. Такође, велики број смртних исхода у горе поменутих примерима јасно указује и на недовољност, односно релативну неефикасност савремене терапије тровања овим једињењима.

1.2. Токсиколошки значај ОФ једињења

Први извештај који указује на токсичност естара фосфорне киселине за сисаре појављује се 1932. године у Лангеовим записима о резултатима синтезе двају диалкил фосфонофлуоридата. На крају текста овог записа каже се да њихове паре имају пријатан и снажно ароматичан мирис, али да се неколико минута по удисању осети јако стезање у гркљану и отежано дисање. Аутор наводи да у каснијем току наступа лако помућење свести и помрачење видног поља са болном преосетљивошћу очију на светлост. Ови симптоми се повлаче тек после више часова (Karczmar 1970).

Увођењем Шрадерових орғанофосфорних пестицида у пољопривреду, није само унапређена борба против биљних штеточина, већ се увећао и асортиман комерцијално доступних хемикалија којима може да буде угрожено здравље људи и домаћих животиња (Oehme 1992, Saadeh i sar 1996, Tsatsakis i sar 1996).

Овај проблем је посебно изражен у неразвијеним земљама где се пестициди примењују често и неконтролисано, уз недоследну примену мера личне и колективне заштите. У нашој земљи, као инсектициди, су тренутно у употреби 23 активне материје из групе ОФ једињења, на бази којих је комерцијално доступно 86 формулација (Митић 2010).

Као фактори угрожавања људског здравља, ОФ једињења заузимају веома високо место. Наиме, ОФ инсектициди су узрочници 80-90 % случајева свих акутних тровања људи пестицидима. Годишње се у свету региструје око 100000 случајева акутног тровања ОФ једињењима. Од овог броја, око 20 % припада групи акциденталних тровања, а суицидних је око 70 %. У 30 % случајева акутних тровања овим једињењима регистрован је летални исход (Siwach and Gupta 1995, Fabritius and Balasescu 1996, Leveridge 1998).

1.2.1. Малатион

Малатион припада групи несистемских ОФ инсектицида широког спектра. По уласку у организам, иреверзибилно се везује за ензим холинестеразу, па се у неким документима, захваљујући свом коначном фармакодинамском ефекту, назива и *органофосфатни парасимпатомиметик*. Уведен је у свакодневну праксу 1950. године а користи се у пољопривреди за сузбијање инсеката који нападају повртарске културе и воће, за контролу популације инсеката у комуналној хигијени и у медицини за ерадикацију ектопаразита и ваши главе и лица. За медицинске сврхе користе се препарати са малим (0,5 %) концентрацијама малатиона.

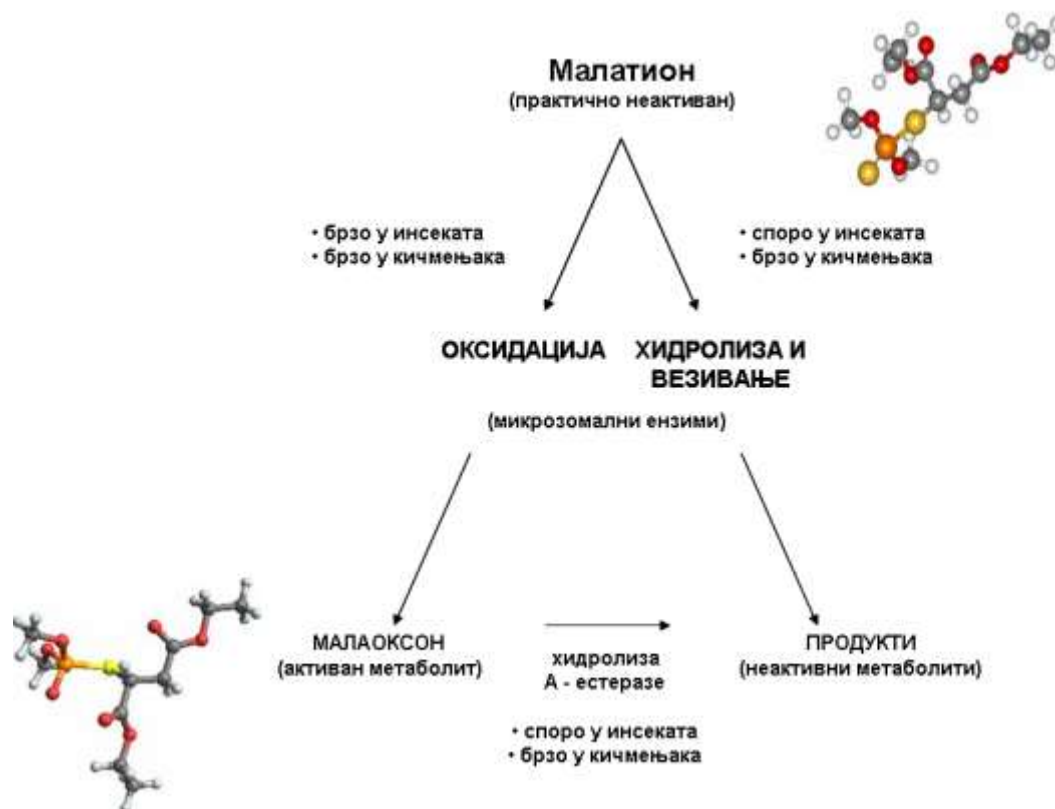
У САД то је најчешће и најшире коришћени ОФ инсектицид . У нашој земљи, у облику различитих формулација, користи се под општим називом Етиол. Постоји у различитим формулацијама, као једини активни принцип или у смешама са другим пестицидима.

Малатион је слабо токсично једињење, када се примени пероралним путем, распон LD₅₀ вредности за пацова креће се од 1000-10000 мг/кг односно од 400-4000 мг/кг за мишеве (Gallo i Lawryk 1991, Kidd i James 1991). Знаци токсичности идентични су онима који се виђају у интоксикацијама другим ОФ једињењима.

Акутни ефекти малатиона зависе пре свега од аналитичке чистоће формулације и пута уношења. Од других фактора који утичу на токсичност малатиона издвајају се количина протеина у исхрани и пол. Захваљујући разликама у метаболизму, депоновању и екскрецији, у експерименталним и клиничким студијама је утврђено да је женски пол осетљивији на токсична дејства малатиона (Menzer 1987).

Малатион се брзо и ефикасно апсорбује независно од пута примене (гастроинтестинални тракт, кожа, слузокожа, плућа). Механизми детоксификације у организму слични су као и за друга ОФ једињења али је наглашен значај карбоксилестераза (CarbE) које доводе до детоксикације малатиона путем хидролизе једне естарске везе отрова (Jokanović, 2010).

Птице и сисари поседују далеко већу активност CarbE у односу на инсекте. Ова чињеница омогућава птицама и сисарима (за разлику од инсеката), да детоксикују малатион много брже у односу на брзину процеса стварања токсичног метаболита малаоксона. Стога се, поред мале токсичности за човека, отворила могућност да се ова особина малатиона искористи за борбу против инсеката (Јокановић, 2010). Претклиничке студије указују да се малатион брзо елиминише путем урина, измета и издахнутог ваздуха. Полувреме елиминације отрова у пацова износи приближно 8 сати (Gallo i Lawryk, 1991). За испољавање токсичног ефекта малатиона неопходна је његова биоактивација. Биоактивација је примарно посредована ензимом цитохромом П450 у јетри, током које се ствара активни метаболит малаоксон. На Слици 1. приказана је биотрансформација малатиона и релативна брзина ензимских реакција у инсеката и кичмењака. Динамика промена (метаболизам) почетног једињења јасно указују на разлоге коришћења малатиона у ерадикацији штетних инсеката.



Слика 1. Биотрансформација малатиона и релативна брзина ензимских реакција у инсеката и кичмењака

У експериментима на пацовима (малатион је даван пероралним путем) је показано да је овај активни метаболит 61 пута токсичнији од малатиона (Edwards, 2007).

Важна је чињеница да је малатион ОФ једињење које се у јако алкалној средини хидролизује скоро тренутно (pH 12); при pH 9 хидролитичка разградња траје 12 сати. При нижим pH вредностима (pH око 6) хидролиза траје 21 недељу.

Потенцирање токсичности ОФ једињења запажено је и код техничких формулација ОФ инсектицида, у којима су, поред декларисане активне супстанце, као инхибитори CarbE биле присутне и друге нечистоће. Стога је и њихова токсичност била далеко већа од очекиване. Током акције ерадикације маларије у Пакистану, због неповољних услова чувања техничке формулације малатиона (повишена спољашња температура и влага) дошло је до изомеризације и стварања изомалатиона, чија је токсичност 100 пута већа у односу на малатион, као и других нечистоћа које су имале структуру органофосфата (Aldridge i sar, 1979). Том приликом затровано је неколико хиљада радника са високим процентом леталног исхода (Baker i sar, 1978).

У Табели 1 дат је приказ акутне токсичности различитих формулација малатиона, онечишћења формулација и његових активних метаболита, у пацова. Уочава се релативно мала токсичност формулација велике аналитичке чистоће и велики токсични потенцијал изомалатиона и малаоксона. У највећем броју испитивања акутна токсичност је регистрована после 24 сата а само изузетно у периоду до 7 дана.

Табела 1. Литературни подаци о токсичности малатиона (различите формулације, метаболити), после пероралне примене отрова у пацова

Једињење (% активне материје)	LD ₅₀ (мг/кг)	Време праћења	Literatura
Малатион (99,7)	8000	7 дана	Pellegrini i Santi (1972)
	12500	24 сата	Umetsu (1972)
	9500	24 сата	Umetsu (1973)
	10700	6-40 сати	Thomsen i Cheminova (1973)
Малатион (96,0)	734	24 сата	Kovačević i sar. (1987)
Малатион (82,0-97,0)	5400 (m) 5700 (ž)	24 сата	NPIC (2009)
Малатион (50,0)	1122	24 сата	Kovačević i sar. (1987)
	1000-2000	24 сата	NPIC (2009)
	450-1400	24 сата	Izmerov (1982)
Изомалатион	120	24 сата	Umetsu (1977)
	89	24 сата	CMD 67-68 (1967)
	113	8-50 сати	Aldbridge (1979)
Малаоксон	158	24 сата	NPIC (2009)
	450	7 дана	Pallegrini i Santi (1972)

м-мужјаци

ж-женке

1.3. Механизам деловања ОФ једињења

ОФ једињења инхибирају све ензиме типа естераза, а посебно ацетилхолинестеразу (AChE, права ацетилхолинестераза EC 3.1.1.7.) и бутирилхолинестеразу (BChE, pseudoholinesteraza EC 3.1.1.8.). Сер Henry Hallet Dale, пионир истраживања физиолошке улоге ацетилхолина, је још 1914. године први претпоставио да у организму постоји "естераза која доприноси уклањању активног естра из циркулације" (Karczmar, 1970).

Убрзо је за карбамат физостигмин претпостављено да продужава вагусну брадикардију управо инхибицијом ове естеразе, чиме онемогућава разградњу физиолошког трансмитера ацетилхолина. Ацетилхолинестераза је један од најефикаснијих познатих ензима; један молекула ацетилхолинестеразе у току једног минута може да хидролизује 6×10^5 молекула ацетилхолина (Taylor, 1996).

Физиолошка улога овог ензима је хидролиза неуротрансмitera ацетилхолина, чиме се обезбеђује прекид трајања његовог агонистичког деловања на мускаринске рецепторе (у централном нервном систему, срцу, глатким мишићима и егзокриним жлездама) и никотинске рецепторе (у централном нервном систему, вегетативним ганглијама и на нервно-мишићној плочи). Активни центар ацетилхолинестеразе чине ањонско и естарско место. Карбоксилна група глутаминске киселине ањонског места учествује у правилној оријентацији молекула супстрата (ацетилхолин). Утврђено је такође да естарско место формирају аминокиселине хистидин, тирозин и серин. После формирања реверзибилног комплекса између ензима и ацетилхолина, долази до реакције између ацетил групе ацетилхолина и хидроксилне групе серина, при чему се формирају ацетиловани ензим и молекул холина. Регенерација (деацетиловање) ензима настаје хидролизом естарске везе уз имидазолијум јон хистидина као катализатор и нуклеофилно дејство хидроксилне групе тирозина. Супротно томе, јасна физиолошка функција бутирилхолинестеразе још увек није позната али се претпоставља да учествује у процесима детоксикације ОФ једињења.

ОФ једињења иреверзибилно инхибирају ензим ацетилхолинестеразу (Aldridge i Reiner, 1972). На молекуларном нивоу, процес инхибиције започиње формирањем нестабилне везе између кисеоника ОФ једињења и протона имидазолијум јона, чиме се умањује електронска густина на атому фосфора.

Истовремено се образује интрамолекулска водонична веза између хидроксилних група серина и тирозина повећавајући тако електронску густину на атому кисеоника серина. Овим реакцијама је олакшан нуклеофилни напад на атом фосфора, а тиме и настајање фосфорилизованог ензима. Иреверзибилна инхибиција ацетилхолинестеразе, уз неке друге процесе, значајно отежава рестаурацију поремећене активности холинергичког нервног система и у знатној мери усложњава терапију тровања овим једињењима.

Фосфорилисана ацетилхолинестераза је веома стабилан комплекс и за разлику од ацетилованог ензима, спонтана хидролиза фосфорилизованог ензима је веома спора, па се активност ензима при тровању ОФ једињењима, без терапије реактиваторима холинестеразе, може обновити само *де ново* синтезом или спонтаном реактивацијом ензима (Reiner i Pleština, 1979).

1.4. Клиничка слика тровања ОФ једињењима

Експозиција ОФ једињењима може да доведе до четири клиничка синдрома, који имају различиту патогенезу, прогнозу и који захтевају различиту терапију. Они се јављају након различито дугог латентног интервала после излагања организма човека ОФ једињењу.

То су (Ballantyne and Marrs, 1992):

- акутна холинергичка криза;
- интермедијарни синдром;
- одложена периферна неуропатија;
- друге специфичне лезије органа.

Обзиром на тему ове докторске дисертације, нешто шире ће бити описани феномени који се јављају само током развоја акутне холинергичке кризе. Симптоматологија акутне холинергичке кризе се јавља непосредно по експозицији, односно максимално до 12 сати од момента експозиције. Како је при тровању ОФ једињењима физиолошка функција ензима ацетилхолинестеразе блокирана, слика тровања има карактеристике интоксикације ендогеним ацетилхолином. У зависности од степена инхибиције ацетилхолинестеразе и повећања садржаја ацетилхолина, ОФ једињења доводе до стимулације односно парализе преноса нервних импулса у централним и неуроефекторним синапсама холинергичког нервног система.

У клиничкој слици тровања разликују се: мускарински ефекти (брадикардија, бронхоконстрикција, бронхореја, хипотензија, појачани мотилитет гастроинтестиналног тракта, абдоминални грчеви, миоза, хиперсаливација), никотински ефекти (хипертензија, тахикардија, фасцикулација, некроза скелетних мишића), као и централни токсични феномени (тремор, инкоординација покрета, конвулзије, централна депресија дисања, кома и смрт) (Namba et al., 1971). Узрок настанка смрти после акутног тровања ОФ једињењима је најчешће респираторна инсуфицијенција централног и периферног порекла која се манифестује као асфиксија, односно престанак дисања, праћена хипоксемијом и цијанозом. Периферни фактори укључују такозвани "плућни мускарински синдром" (ларингоспазам, бронхоконстрикција, хипербронхореја) и деполаризациону парализу респираторне мускулатуре, посебно дијафрагме (Rivett and Potgieter, 1987). Централни ефекти су последица прекида тзв. „респираторног драјва“, чија је једна од битних компоненти и респираторни центар.

1.5. Терапија тровања органофосфорним једињењима

Терапија тровања ОФ једињењима подразумева примену специфичних лекова односно антидота као и примену класичних неспецифичних и симптоматских мера и поступака. У оквиру специфичне терапије примењују се атропин као антагониста мускариних рецептора и оксими као реактиватори инхибиране холинестеразе (Sidell, 1989). Конвенционална терапија подразумева и примену бензодиазепина, чија је, пре свега антиконвулзивна и миорелаксатна ефикасност, потврђена у бројним експерименталним и клиничким студијама (Inns and Leadbeater, 1983; Leadbeater, 1988; Bokonjić, 1989; 1991).

1.5.1. Атропин

Атропин, дат као монотерапија, испољава ефикасност у тровањима ОФ инсектицидима (Sanderson, 1961) и нервним бојним отровима (Inns and Leadbeater, 1983). Релативно скромни заштитни индекси добијени применом атропина у тровањима неким групама ОФ једињења (Rump et al., 1976; Mesić et al., 1991; Dawson, 1994) и чињеница да атропин испољава ефекте на никотинске рецепторе само при веома високим дозама, указују да терапија атропином често није довољна за лечење тровања овим отровима. Ипак, он и данас представља основу сваке терапије тровања антихолинестеразама (Kušić and Bošković, 1984).

1.5.2. Реактиватори холинестеразе (оксими)

Први широко коришћени реактиватор инхибиране ацетилхолинестеразе био је пиридин-2-алдоксим (ПАМ-2). За овај оксим је утврђено да за око милион пута брже реактивира фосфорилисани ензим од првобитно испитиваног хидроксиламина (Bismuth et al., 1992). Синтеза монопиридинских оксима (којима припада и ПАМ-2) развијала се у правцу варирања ањонске компоненте и положаја оксимске групе, у циљу побољшања хидросолубилности и терапијског ефекта. Тако је дошло до развоја серије аналога пиридин-2-алдоксима. Даља истраживања антидота са оксимским карактеристикама дала су једињења биспиридинске структуре, међу којима значајно место припада тримедоксиму и обидоксиму. У односу на монопиридинске, биспиридински оксими показују бољи заштитни и реактиваторски потенцијал, токсичнији су и слабије пролазе кроз ћелијске мембране.

Последњој генерацији биспиридинских оксима припадају оксими “Х” серије. Неки од ових антидота приближили су се теоријском концепту универзалног оксима. За тумачење укупног антидотског ефекта оксима важна су најмање три механизма дејства. Оксими реактивирају инхибирани ензим, при вишим дозама реверзибилно инхибирају ензим што представља механизам заштите реактивираних, још неинхибираних и *де ново* синтетисаних холинестераза и могу да реагују директно са ОФ једињењима..

Показано је да оксими испољавају и директне антимукаринске, антеникотинске и ганглиоблокаторске ефекте, а сматра се такође да могу учествовати у механизмима адаптације постсинаптичке мембране као одговор на високе нивое ацетилхолина (Busker et al., 1991; Van Helden et al., 1996). Реактивација инхибираних холинестераза представља процес дефосфорилације инхибираног ензима. Започиње одговарајућом оријентацијом молекуле оксима у односу на активни центар ензима.

Састоји се из две фазе: прва подразумева стварање интермедијерног комплекса оксима са фосфорилисаним ензимом, а друга подразумева нуклеофилни напад на атом фосфора који је везан за серински остатак активног центра ензима. Након тога следи дифузија фосфорилисаног оксима са активног центра (Worek et al., 1999).

Крајем педесетих година почиње са увођењем у клиничку праксу новосинтетисаног оксима ПАМ-2. По први пут у клиничкој пракси показана је његова антидотска моћ у болесника отрованих паратионом (Namba and Hiraki, 1958).

Сличан ентузијазам, уз неуједначени терапијски ефект (експерименталне, клиничке студије, компаративне студије ефикасности), пратио је и увођење каснијих, новијих реактиватора инхибираних холинестераза тримедоксима, обидоксима и оксима НН-6 (Bošković et al., 1984; Karalliedde and Senanayake, 1989; Masuda et al., 1995; Worek et al., 1996).

Најуниверзалнију антидотску моћ испољио је оксим НН-6, иако се показало да није у довољној мери ефикасан у тровањима ОФ инсектицидима (Worek et al., 1996).

И поред чињенице да биспиридински оксими имају најшири спектар антидотског дејства када је реч о ОФ инсектицидима, Bismuth et al., (1992) наводе да у случају тровања кротоксифосом, деметоном, диметоатом, димефоксом, метил-фенкаптоном, морфотионом, шраданом, протоатом или триамифосом, сви до сада познати оксими показују ограничену ефикасност. По мишљењу истакнутих претклиничких и клиничких токсиколога, оксими могу бити неефикасни код тровања ОФ једињењима из следећих битних разлога (Worek et al., 1996):

1) Реинхибиција ацетилхолинестеразе је бржа од реактивације. Могући узроци су: препоручене дозе оксима су недовољне да би се постигла оптимална концентрација у плазми и превазишла брза реинхибиција (тешка тровања ОФ једињењима); фосфорилисани оксим може да инхибира реактивирани ензим брзином већом од брзине његове елиминације или трансформације у нетоксичне производе.

2) Оптимална концентрација оксима се не одржава довољно дуго. Перзистенција високо липофилних ОФ једињења у организму је обично дужа и захтева континуирано присуство терапијских концентрација оксима.

Стога је претпостављено да би се продужењем полувремена елиминације оксима могао повећати њихов терапијски ефекат, али досадашња истраживања нису дала очекиване резултате (Jeevarathinam et al., 1988). Оксими се као поларне и волуминозне молекуле одликују слабом пенетрацијом у ткива, при чему монопиридинска једињења због нешто бољег партиционог коефицијента (маст/вода) имају неколико пута већи волумен дистрибуције. Такође, утврђено је да оксими веома слабо пролазе кроз хематоенцефалну баријеру, па је извесно да су у мозгу регистроване концентрације оксима десетоструко ниже него у циркулацији.

Око 60-90 % од примењене дозе оксима се веома брзо елиминише у непромењеном облику урином, процесом гломеруларне филтрације и активном тубуларном секрецијом (Jeevarathinam et al., 1988).

1.5.3. Антиконвулзиви

Посебан проблем у тровањима ОФ једињењима представљају мишићне фасцикулације и конвулзије, које се не могу у потпуности антагонизовати применом атропина и оксима (Sellström, 1992). Осим тога, конвулзивна активност може довести до ирреверзибилног оштећења мозданог ткива. Mc Donough et al., (1987) and Shih (1990) су показали да је централна холинергичка хиперстимулација, пре свега субкортикалних структура (стријатни комплекс), примарни и критично важан чинилац за настајање конвулзија у раној фази акутног тровања ОФ једињењима.

Накладни поремећаји осталих неуротрансмитерских система (серотонин, катехоламини, γ -аминобутерна киселина, екситаторне аминокиселине и тзв. “секундарни гласници” – циклични гуанозин монофосфат), у великој мери су одговорни за одржавање и пропагацију конвулзивне активности у ЦНС-у (Caracio and Shih, 1991; Shih and McDough, 1997; Jacobsson et al., 1997a; 1997b). Стога је сасвим јасно да се описани поремећаји не могу у потпуности купирати само антихолинергичким лековима.

Бензодиазепини (БДЗ) представљају далеко најзначајнију групу антиконвулзивних лекова у терапији тровања ОФ једињењима. Диазепам је био први лек за кога је показано да отклања конвулзије изазване нервним бојним отровом соманом али да испољава и синергистички ефекат када се примени са атропином (Lipp, 1972).

Показано је такође да профилактичка примена диазепам спречава патолошке промене на мозгу пацова трованих соманом (Martin et al., 1985). Делујући преко специфичних БДЗ рецептора, функционално повезаних са ГАБА рецепторима, БДЗ олакшавају трансмисију γ -аминобутерне киселине, кључног инхибиторног трансмитера у ЦНС-у, који учествује у контроли и регулацији баланса екситаторних и инхибиторних процеса (Braestrup and Squires, 1977). И неки други представници групе БДЗ лекова, као што је на пример мидазолам, испољавају (у квалитативном и квантитативном смислу) ефекте сличне ефектима диазепам (Bokonjić and Rosić, 1991).

Код намерно изазване хиператропинизације (акутна тровања ОФ једињењима), клиничка примена БДЗ, антагонизовањем екситаторних ефеката атропина, има такође пуни смисао.

1.6. Перспективе терапије тровања ОФ једињењима

ОФ хидролазе као што је параоксоназа сисара (Sogorb i Vilanova, 2002) могу довести до хидролизе ОФ једињења, омогућавајући у кратком временском року смањење токсичних концентрација отрова. Клонидин: у експерименталним студијама показано је да инхибира ослобађање Асh у холинергичким синапсама и да поседује агонистички ефект на адренергичким неуронима. Профилактичка примена у животиња обезбеђује веће преживљавање (Liu, 1991). Антагонисти НМДА рецептора (гациклидин): експерименти у примата показали су користан терапијски ефекат у смислу опоравка нарушених телесних функција ако се гациклидин примени профилактички (Lallement et al., 1999).

Претходна три правца истраживања нису у довољној мери клинички потврђена па за сада, још увек, имају само теоретски значај.

1.6.1. Натријум бикарбонат

Коришћење натријум бикарбоната у терапији различитих типова тровања познато је већ дуго низ година. То се посебно односи на терапију у случају предозирања аспирином, фенобарбитоном и трицикличним антидепресивима (Haddad et al., 1998; Schonwald, 2001). Покушаји да се алкализацијом крви поправи исход у тровањима ОФ инсектицидима датирају још пре три деценије. У раду (Palacio, 1982) показано је да алкализација крви, изазвана инфузијом натријум бикарбоната, смањује интензитет знакова токсичности и морталитет у пацова трованих метил азинфосом. У паса трованих инсектицидом дихлорвосом (Cordoba et al., 1983), блага алкализација крви путем инфузије натријум бикарбоната, довела је до преживљавања у 84,6 % паса.

У клиничким и експерименталним радовима (Wong, 1996; Wong et al., 1998), који су спроведени на људима (углавном тровања диазиноном) и пацовима (различити типови ОФ инсектицида) показано је да примена натријум бикарбоната поправља клиничку слику тровања и смањује морталитет.

У експерименталном раду (Bajgar et al., 2001) испитиван је потенцијално користан ефект натријум бикарбоната (3 mmol/kg ip) у пацова интоксичираних са 2 LD₅₀ сарина, дихлорвоса или пиридостигмина. Аутори закључују да примена натријум бикарбоната испољава терапијски ефект како у тровању ОФ једињењима тако и у случају тровања пиридостигмином, посебно када се комбинује са атропином.

У испитивању иранских аутора (Balali Mood et al., 2000) болесници тровани различитим ОФ инсектицидима били су третирани атропином и/или натријум бикарбонатом све до опоравка или смрти болесника. Ова (по савременим критеријумима) недовољно контролисана клиничка студија, ипак је показала да примена натријум бикарбоната може бити корисна у склопу стандардне терапије тровања ОФ инсектицидима. Даље студије истих аутора (Balali-Mood et al., 2002; 2005), показују да, натријум бикарбонат, дат путем инфузије у дозама које су скоро два пута веће него у првој студији (5 mEq/kg), увођење натријум бикарбоната поправља клиничку слику затрованих. Најзначајнији налази ових студија су да, примена натријум бикарбоната, смањује укупно примењену дозу атропина као и потребу увођења вештачке вентилације у затрованих болесника.

У експерименталном раду Стефановић et al., (2006) испитиван је утицај натријум бикарбоната (3 ммол/кг ип) на заштитне ефекте атропина (10 мг/кг), тримедоксима (10 мг/кг) и обидоксима (10 мг/кг), датих појединачно или у комбинацији, у пацова трованих инсектицидом дихлорвосом.

Утврђено је да корекција ацидо-базног статуса (изазвана применом натријум бикарбоната) значајно повећава заштитне ефекте примењених антидота. Статистички значајна корелација између заштитних дејстава и праћених гасних параметара артеријске крви пацова посебно је била изражена у групи која је поред атропина третирана и натријум бикарбонатом. Увођење реактиватора холинестеразе у терапију довело је до даљег, вишеструког, увећања заштитног дејства антидота.

2. РАДНА ХИПОТЕЗА

Поједини представници ОФ инсектицида (диметоат, метил паратион, трихлорфон, малатион и др.) су веома стабилни у киселој средини. Разумљиво је стога, да ће свако померање рН у смислу алкализације допринети њиховој бржој разградњи (хидролизи).

Подаци из литературе указују да је малатион ОФ једињење које се у јако алкалној средини хидролизује скоро тренутно (рН 12), при рН 9 хидролитичка разградња траје 12 сати а при јако ниским рН вредностима (рН 6) хидролиза траје чак 21 недељу.

Наравно, ови експериментални подаци, добијени у *ин витро* условима, не могу бити из разумљивих разлога репродуковани у живом организму будући да су горе поменути распони рН инкопатибилни са одвијањем основних животних процеса у организму.

Ипак, одређени број експерименталних и клиничких студија указује да алкализација крви, применом натријум бикарбоната, ублажава токсичне знаке тровања ОФ једињењима што има за последицу смањење укупне примењене дозе атропина, смањење потребе за коришћење механичке вентилације и др.). Поред тога, показано је да истовремена примена натријум бикарбоната, побољшава ефекте стандардне антидотске терапије (атропин, реактиватори холинестеразе) у смислу заштите од вишеструких леталних доза ОФ једињења.

Када је реч о тровању малатионом, хидролиза његовог активног метаболита малаоксона је још више убрзана у условима алкалне средине (у односу на малатион). Будући да су сви метаболити малаоксона углавном нетоксични, убрзаном хидролизом овог једињења, за очекивати је да ће и релативно умерени пораст рН крви, настао применом натријум бикарбоната, довести до побољшања исхода тровања малатионом у пацова.

3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

1. У пацова перорално трованих средњом леталном дозом (LD_{50}) малатиона, одређивањем бројних гасних параметара артеријске крви, проценити ацидо-базни статус и метаболичке промене током акутне фазе тровања (10 минут, 6 и 24 сата после интоксикације).
2. Праћењем гасних параметара артеријске крви пацова, одредити оптималну појединачну дозу натријум бикарбоната која, *пер се*, неће довести до значајних поремећаја виталних функција организма.
3. Испитати могућност антагонизовања метаболичких поремећаја насталих применом малатиона давањем натријум бикарбоната (10 минута после истовремене примене, моменат највеће алкализације крви пацова).
4. Одредити гасне параметре артеријске крви пацова 24 сата после примене апсолутно смртних доза ($1,3 LD_{50}$) малатиона и различитих комбинација антидота (даваних *пер се* или у комбинацији са натријум бикарбонатом).
5. Утврдити број и проценат преживелих животиња 24 сата после примене апсолутно смртних доза ($1,3 LD_{50}$) малатиона и различитих комбинација антидота (даваних *пер се* или у комбинацији са натријум бикарбонатом) и овај налаз корелисати са резултатима гасних анализа у наведеној временској тачки.

4. МЕТОДЕ РАДА

Истраживање ове докторске дисертације урађено је у Лабораторији Одељења за експерименталну токсикологију и фармакологију, Института за токсикологију и фармакологију, Центра за контролу тровања, Војномедицинске академије Београд. Укупно претклиничко истраживање од самог почетка експерименталног протокола испитивања до самог завршетка испитивања трајало је од 2007. године до 2011. године у укупном временском трајању од четири године. Ова претклиничка студија је одобрена од стране Етичког Комитета Војномедицинске академије Београд.

4.1. Супстанце

У студији су коришћене следеће супстанце:

- Натријум бикарбонат-(Одељење за токсиколошку хемију, Центар за контролу тровања, ВМА, Београд).
- Малатион (Галеника-Фитофармација а.д., Београд). Аналитичком провером утврђен је степен чистоће од 96,0 % малатиона.
- Пралидоксим хлорид (ПАМ-2)-(Клиника за ургентну и клиничку токсикологију, Центар за контролу тровања, ВМА, Београд). Аналитичком провером (HPLC) утврђен је степен чистоће од 99,0 %.
- Атропин сулфат-(Sigma Comp., Ст. Луис, САД).
- Диазепам (*Бенседин*, Галеника, Београд).
- Хепарин-(*Хепарин*, Галеника, Београд).
- Стандард малаоксона-(Одељење за токсиколошку хемију, Центар за контролу тровања, ВМА, Београд).

Све друге хемикалије аналитичке чистоће набављене су из комерцијалних извора. Сви раствори су на одговарајући начин припремани непосредно пре употребе.

4.2. Животиње

У експериментима су коришћени пацови соја Wistar (220-250 г.), мушког пола, који су добијени из матичног легла Фарме експерименталних животиња ВМА Београд. По доласку у Виваријум ВМА, све животиње имале су период адаптације од 7 дана пре почетка експеримента. Приступ храни и води био је слободан 24 сата (ad libitum) у том периоду а експерименталним животињама је ускраћивана храна 12 сати пре започињања експерименталних процедура. После каудовертебралне фиксације експерименталних животиња на тврдим подлогама приступљено је обостраној торакотомiji и интракардијалном узорковању артеријске крви испитиваних животиња из леве срчане коморе.

После адекватног интракардијалног узорковања артеријске крви испитиваних пацова приступљено је еутаназији наведених испитиваних пацова применом цервикалне деструкције у мери минималног стреса и безболности по испитивану експерименталну животињу поштовајући стриктно прописане Етичке параметре безболности и поузданости. Потврда угинућа наведених испитиваних експерименталних животиња констатована је трајним прекидом кардиоваскуларне циркулације и тоталном механичком цервикалном деструкцијом. Протокол експерименталне студије базиран је на Водичу за животињске студије бр. 282-12/2002 (Етички Комитет, Војномедицинска Академија, Београд), Правилник за рад са експерименталним животињама (Медицински факултет у Београду, 25.06. 2004), EC Council Directive 86/609/EEC (1986), EC Council Directive 2003/65 (2003) .

4.3. Акутна токсичност

4.3.1. Испитивање акутне токсичности малатиона

Пацовима су путем гастричне сонде даване растуће дозе малатиона (280, 440, 600 и 760 мг/кг). За сваку дозу коришћена је група од 6 животиња, са укупно 24 испитиване експерименталне животиње. Летални ефект је регистрован 24 сата после апликације отрова. Добијени резултати су послужили за израчунавање средње леталне дозе (LD₅₀) (Litchfield and Wilcoxon, 1949) .

4.3.2. Испитивање заштитног ефекта натријум бикарбоната

У првом сету експеримената испитан је утицај растућих доза натријум бикарбоната (1, 2, 3 и 4 ммол/кг *ип*) на 24-часовно преживљавање пацова трованих апсолутно смртном дозом (1,3 LD₅₀) малатиона. За сваку групу коришћено је 5 експерименталних животиња у 4 испитиване групе са укупно 20 испитиваних експерименталних животиња. Натријум бикарбонат је даван непосредно после пероралне апликације малатиона.

4.3.3. Испитивање заштитног ефекта антидота

У другом сету експеримената испитан је ефекат стандардних антидота (датих *пер се* или у комбинацији) на 24-часовно преживљавање пацова трованих апсолутно смртном дозом (1,3 LD₅₀) малатиона. Укупно је било 6 испитиваних група и за сваку групу коришћено је 6 експерименталних животиња са укупно 36 испитиваних експерименталних животиња.

Антидоти, атропин (10 мг/кг *ип*), ПАМ-2 (10 мг/кг *ип*) и диазепам (5 мг/кг *ип*) примењени су појединачно или у комбинацији са натријум бикарбонатом (3 ммол/кг *ип*) непосредно после пероралне апликације малатиона. Заштитни ефекти процењивани су на основу % преживелих животиња у свакој групи 24 сата после третмана (Litchfield and Wilcoxon, 1949) .

4.4. Гасне анализе артеријске крви пацова

У биохемијском делу експеримената, урађене су следеће анализе артеријске крви пацова (уз сваки параметар дато је кратко објашњење):

Гасни параметри

- рН вредност – **рН**

Познато, бубрези и плућа играју кључну улогу у регулацији рН у тровању.

- парцијални притисак кисеоника – **pO₂ (mmHg)**

Дефинише се као парцијални притисак O₂ (гасна фаза) у еквилибријуму са крвљу. У артеријској крви високе вредности (хипероксемија), ниске вредности (хипоксемија). Овај параметар је индикатор преузимања кисеоника у плућима (Varagić and Stevanović, 1990).

- парцијални притисак угљен диоксида – **pCO₂ (mmHg)**

Дефинише се као парцијални притисак CO₂ (гасна фаза) у еквилибријуму са крвљу. Високи ниво у артеријској крви (хиперкапнија), низак ниво (хипокапнија). Због лаког пролаза CO₂ кроз ћелијске мембране, представља директан показатељ адекватности алвеоларне вентилације у односу на његову метаболичку продукцију (Varagić and Stevanović, 1990).

Ацидо-базни статус

- концентрација базног пуферског система – **cBase (mmol/l)**

Стандардни базни ексцес је квалитетан показатељ вишка базних једињења у живом организму. Одражава вишак база у укупном екстрацелуларном простору, где крв, као интраваскуларни део, представља 1/3 добијене вредности (Varagić and Stevanović, 1990).

- концентрација слободних бикарбонатних јона – **cHCO₃⁻ (mmol/l)**

Представља концентрацију бикарбоната у плазми узорка. Израчунава се преко измерених вредности pH и pCO₂ (Henderson-Hasselbalchovom једначина). Повећане концентрације могу бити због примарне метаболичке алкалозе или као компензаторни одговор на примарну респираторну ацидозу. Смањење нивоа се налази у случају метаболичке ацидозе и као компензаторни одговор у случају примарне респираторне алкалозе (Varagić and Stevanović, 1990).

Оксигени статус

- концентрација резидуалног кисеоника – **ctO₂c (Vol %)**

Представља концентрацију укупног кисеоника у крви, збир је концентрације кисеоника везаног за хемоглобин и концентрације физички раствореног кисеоника. Израз је интегралног статуса транспорта кисеоника у крви (Varagić and Stevanović, 1990).

- парцијални притисак резидуалног кисеоника – **p50c (mmHg)**
Дефинише се као притисак O₂ када је сатурација крви кисеоником 50 %. Главни је дескриптивни параметар за процену преноса кисеоника у ткива. У великој мери зависи од вредности рН крви али и друге физичке и хемијске промене у организму могу да утичу на афинитет хемоглобина за кисеоник (Varagić and Stevanović, 1990) .

Оксиметријски параметри

- концентрација хемоглобина – **ctHb (g/dl)**
Познато, представља не-бикарбонатни пуфер у крви.
- процентуална сатурација кисеоника – **sO₂ (%)**
Засићење крви кисеоником, дефинише се као % хемоглобина присутног у артеријској крви за који је везан кисеоник (Varagić and Stevanović, 1990) .
- процентуална везаност кисеоника за хемоглобин – **FO₂Hb (%)**
Дефинише се као фракција оксихемоглобина (однос O₂Hb и укупног Hb). Мера је степена искоришћености потенцијалног транспортног капацитета за кисеоник (Varagić and Stevanović, 1990) .
- процентуална везаност угљен монооксида за хемоглобин – **FCOHb (%)**
Дефинише се као фракција карбоксихемоглобина (однос COHb и укупног Hb). Угљен моноксид се веже реверзибилно за хемгрупу Fe²⁺ јона али је афинитет хемоглобина за угљен моноксид 200-250 пута већи од афинитета за кисеоник. Карбоксихемоглобин не може транспортовати кисеоник и стога је резултат високих вредности карбоксихемоглобина смањење транспортних могућности крви за кисеоник (Varagić and Stevanović, 1990) .
- концентрација метхемоглобина изражена у процентима – **FHHb (%)**
Дефинише се као фракција метхемоглобина (однос MetHb и укупног Hb). Метхемоглобин настаје када се феро јон (Fe²⁺) у хем групама путем оксидације трансформише у фери јон (Fe³⁺). Метхемоглобин не може да транспортује кисеоник па се смањују транспортне могућности крви за кисеоник (Varagić and Stevanović, 1990).

Метаболички параметри

- концентрација глукозе – **cGlu (mmol/L)**

Представља концентрацију глукозе у плазми. Глукоза представља базични извор енергије за периферна ткива осим у случају продуженог гладовања. Јетра представља главни орган који спречава велики пад глукозе током гладовања, омогућавајући ослобађање гликогена из депоа или синтезом прекурсора као што су лактат, пируват, глицерол или аминокиселине. Значај у тровању ОФ једињењима овог метаболичког параметра је у томе што нам указује на последично смањење јетрине функције у детоксикационим процесима гликонеогенезе и општег детоксикационог јетриног потенцијала а последично повећане гликолизе и пада концентрације глукозе у крви отрованих животиња (Varagić and Stevanović, 1990).

- концентрација млечне киселине – **cLac (mmol/L)**

Представља концентрацију млечне киселине у плазми. Млечна киселина је метаболит пирувата, продукт гликолизе и субстрат за циклус лимунске киселине. У плазми здравих јединки је присутна у ниском нивоу. Главни извори млечне киселине су црвена крвна зрнца, кожа и централни нервни систем. Ниво у крви зависи од баланса продукције и елиминације из организма. Повишени ниво млечне киселине у крви (могућа лактична ацидоза) може бити последица повећане продукције, смањене елиминације или оба узрока. У тровањима ОФ једињења последично се јавља повећане концентрације лактата и показатељ је метаболичке ацидозе (Varagić and Stevanović, 1990).

- концентрација билирубина – **ctBil (μmol/L)**

Познато, укупни билирубин. Око 85 % укупног билирубина настаје из хемоглобина еритроцита (Varagić and Stevanović, 1990). У тровањима ОФ једињењима последично се јавља пад концентрације билирубина као показатељ опште јетрине дисфункције и инсуфицијенције (Varagić and Stevanović, 1990).



Слика 1. Гасни анализатор АБЛ 700

4.5. Протоколи испитивања ацидо-базног статуса артеријске крви пацова

4.5.1. Испитивање ацидо-базног статуса после примене NaHCO_3

Утицај растућих доза натријум бикарбоната (1, 2, 3 и 4 ммол/кг *ип*) на ацидо-базни статус крви пацова испитиван је 10 минута после апликације NaHCO_3 . За сваку испитивану дозу коришћено је 6 експерименталних животиња (4 испитиване групе) са укупно 24 испитиваних експерименталних животиња.

4.5.2. Испитивање ацидо-базног статуса после примене средње леталне дозе (1 LD_{50}) малатиона

Утицај средње леталне дозе малатиона (621,6 мг/кг *по*) на ацидо-базни статус крви пацова испитиван је 10 минута, 6 сати и 24 сата после интоксикације малатионом. За сваки временски интервал коришћене су групе од 5 пацова (10 минут) и 6 пацова (6. и 24. сат). У три наведене испитиване групе укупно је испитано 17 испитиваних животиња.

4.5.3. Испитивање ацидо-базног статуса после комбиноване примене малатиона (1 LD₅₀) и NaHCO₃ (3 ммол/кг)

Процена могућности антагонизовања ацидо-базних поремећаја крви пацова изазваних малатионом (1 LD₅₀ *по*) испитана је применом NaHCO₃ (3 ммол/кг *ин*). Натријум бикарбонат је даван непосредно после пероралне апликације малатиона а 10 минута после третмана животиње су жртвоване и узета крв за анализу гасних параметара.

4.5.4. Испитивање утицаја различитих комбинација антидота на ацидо-базни статус крви пацова трованих апсолутно смртном дозом (1,3 LD₅₀) малатиона.

Ефекат стандардних антидота, датих *пер се* или у комбинацији, на ацидо-базни статус крви пацова трованих апсолутно смртном дозом (1,3 LD₅₀) малатиона испитан је 24 сата после третмана. За сваку групу коришћено је 5-8 експерименталних животиња.

Антидоти, атропин (10 мг/кг *им*), ПАМ-2 (10 мг/кг *им*) и диазепам (5 мг/кг *им*) примењени су појединачно или у комбинацији са натријум бикарбонатом (3 ммол/кг *ин*) непосредно после пероралне апликације малатиона.

После жртвовања животиња у одговарајућем временском интервалу, артеријски узорци крви добијени су интракардијалном пункцијом (лева комора) пацова. За узорковање је коришћен хепаринизовани шприц а узорци крви су чувани на леду до анализе.

4.6. Статистичка анализа

Основна анализа праћених параметара извршена је путем стандардних статистичких параметара дескриптивне статистике (средња вредност ± стандардна девијација-СД) или путем регистрације учесталости појаве неких обележја (фреквенција). Средња летална доза (LD₅₀) малатиона израчуната је применом Litchfield-Wilcoxon теста (1949). У зависности од типа поређења (две или више група) коришћен је Студентов Т-тест или анализа варијансе у једном правцу (Такиј-ев тест). Процена значаја утицаја различитих комбинација антидота на преживљавање експерименталних животиња извршена је применом т теста пропорција за независне групе. Поређење дистрибуција фреквенција различитих група извршено је путем χ^2 теста. Значајност разлика испитиваних обележја прихваћена је на нивоу $p < 0,05$. За статистичку анализу коришћен је комерцијални статистички софтвер Statistica 8.0, Stat Soft Inc., Тулса, ОК, САД, 2007.

V. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Токсиколошка дејства малатиона

5.1.1. Израчунавање средње леталне дозе малатиона

Испитивањем на двадесетчетири (24) јединке пацова мужјака, соја Wistar-Albino, тежине од (290-300 гр.), применом растућих доза малатиона израчуната је средња летална доза препарата Ethiol, Fitofarmacija Galenika (активна супстанца малатион), који нам је достављен са прописаном техничком чистоћом активне супстанце од 96,35 % (утврђено методом по Litchfield-Wilkocsonu) и добили да је : **LD₅₀=621,60 mg/kg** наведеног испитиваног препарата. Добијена вредност акутне токсичности , као и њен умножак (1,3 LD₅₀) у даљем току испитивања послужила је за процену токсичних ефеката отрова и терапијских ефеката натријум бикарбоната (NaHCO₃) и других испитиваних антидота. Израчуната LD₅₀ вредност поседује прихватљиве 95% границе поверења.

Табела 5.1. 24-часовна средња летална доза (LD₅₀) малатиона и 95%-границе поверења после пероралне апликације отрова

Дозе малатиона (mg/kg po)	Исход тровања		LD ₅₀ вредност (mg/kg po)	95%-границе поверења
	угинуле	преживеле		
280	0	6	621,60	450,29 – 858,08
440	1	5		
600	2	4		
760	5	1		

5.1.2. Утицај малатиона (1 LD₅₀) на параметре артеријске крви пацова

Гасни параметри артеријске крви пацова третирањих малатионом (1 LD₅₀) у току двадесет четири сата (24 h) приказани су у Табели 5.2.

Табела 5.2. Гасни параметри крви пацова третирањих малатионом (1 LD₅₀ po) 10 минута, 6 и 24 сата после интоксикације

ГРУПЕ	$\bar{X} \pm SD$		
	pH	pO ₂ (mmHg)	pCO ₂ (mmHg)
контрола	7,29 ± 0,09	76,70 ± 16,07	44,61 ± 10,90
малатион			
10 минута	7,25 ± 0,04	24,82 ± 11,02***	47,78 ± 5,32
6 h	7,11 ± 0,11*	56,19 ± 15,71*	52,06 ± 9,41
24 h	7,20 ± 0,07	67,91 ± 22,6	44,68 ± 5,51
Значајност (p) у односу на контролну групу	*p<0,05	*p<0,05 ***p<0,001	p>0,05 n.s.

$\bar{X}$ - средња вредност

SD - стандардна девијација

Прва статистички значајна одступања од вредности контролне групе регистрована су шест сати после тровања пацова малатионом (pH вредност и pO₂ вредност). Значајан пад pH вредности указује на појаву ацидозе. Двадесетчетири сата (24 h) после интоксикације, вредности праћених параметара се не разликују значајно у односу на контролну групу, упркос чињенице да pH вредност и даље указује на присуство ацидозе.

Оксиметријски параметри артеријске крви пацова третирањих малатионом (1 LD₅₀) у току двасетчетири сата (24 h) од момента интоксикације дати су у Табели 5.3.

Табела 5.3. Оксиметријски параметри крви пацова третирањих малатионом (1 LD₅₀ po) 10 минута, 6 и 24 сата после интоксикације

ГРУПЕ	$\bar{X} \pm SD$				
	ctHb (g/dL)	sO ₂ (%)	FO ₂ Hb (%)	FCOHb (%)	FHHb (%)
контрола	11,40 ± 3,80	91,31±17,81	42,62±16,77	1,20 ± 1,03	55,78±18,01
малатион					
10 минута	14,16 ± 0,58	23,34±13,69***	23,28±13,69	-0,32±0,64*	76,68±14,00
6 h	9,11 ± 1,12	70,61±10,62*	50,11±8,90	3,00 ± 1,50*	44,31±15,26
24 h	12,06 ± 2,17	82,92 ± 9,21	51,74±9,89	2,71 ± 1,11*	52,37±11,15
Значајност (p) у односу на контролну групу	p>0,05 n.s.	*p<0,05 ***p<0,001	p>0,05 n.s.	*p<0,05	p>0,05 n.s.

Од параметара приказаних у Табели 4.3. издвојили би (по важности) статистички значајан пад вредности сатурације крви кисеоником 10 минута и 6 сати после тровања малатионом. Сви остали праћени параметри (осим FCOHb) нису се статистички значајно разликовали у односу на вредности контролне групе.

Метаболитички параметри артеријске крви пацова третирањих малатионом (1 LD₅₀) после двадесет четири сата (24 h) од момента интоксикације приказани су у Табели 5.4.

**Табела 5.4. Метаболитички параметри крви пацова третирањих малатионом (1 LD₅₀ po)
10 минута, 6 и 24 сата после интоксикације**

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$		
	cGlu (mmol/l)	cLac (mmol/l)	ctBil (μmol/l)
контрола	4,08 ± 0,76	5,62 ± 1,41	0,17 ± 0,40
малатион			
10 минута	6,08 ± 0,34***	8,44 ± 1,87*	7,60 ± 13,10
6 h	3,67 ± 0,66	5,88 ± 2,10	0,16 ± 0,40
24 h	4,44 ± 1,81	5,29 ± 1,35	0,00 ± 0,00
Значајност (p) у односу на контролну групу	***p<0,001	*p<0,05	p>0,05 n.s.

Праћењем метаболитичких параметара утврђени су статистички значајно повишени нивои глукозе и лактозе у пацова третирањих малатионом у односу на контролну групу (10 минут). У даљем временском току, вредности ових параметара се приближавају вредностима контролне групе.

Оксигени статус артеријске крви пацова третирањих малатионом (1 LD₅₀) после двадесет четири сата (24 h) од момента интоксикације приказани су у Табели 5.5.

Табела 5.5. Оксигени статус крви пацова третирањих малатионом (1 LD₅₀ po) 10 минута, 6 и 24 сата после интоксикације

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$	
	ctO _{2c} (Vol %)	p50 _c (mmHg)
контрола	6,66 ± 2,18	44,81 ± 5,80
малатион		
10 минута	4,70 ± 2,82	39,22 ± 4,63
6 h	4,84 ± 0,85	41,98 ± 4,33
24 h	5,71 ± 1,65	41,58 ± 2,66
Значајност (p) у односу на контролну групу	p>0,05 n.s.	p>0,05 n.s.

Вредности параметара оксигеног статуса крви пацова трованих малатионом (приказани у Табели 4.5.) нису карактеристични за интоксикацију овим отровом.

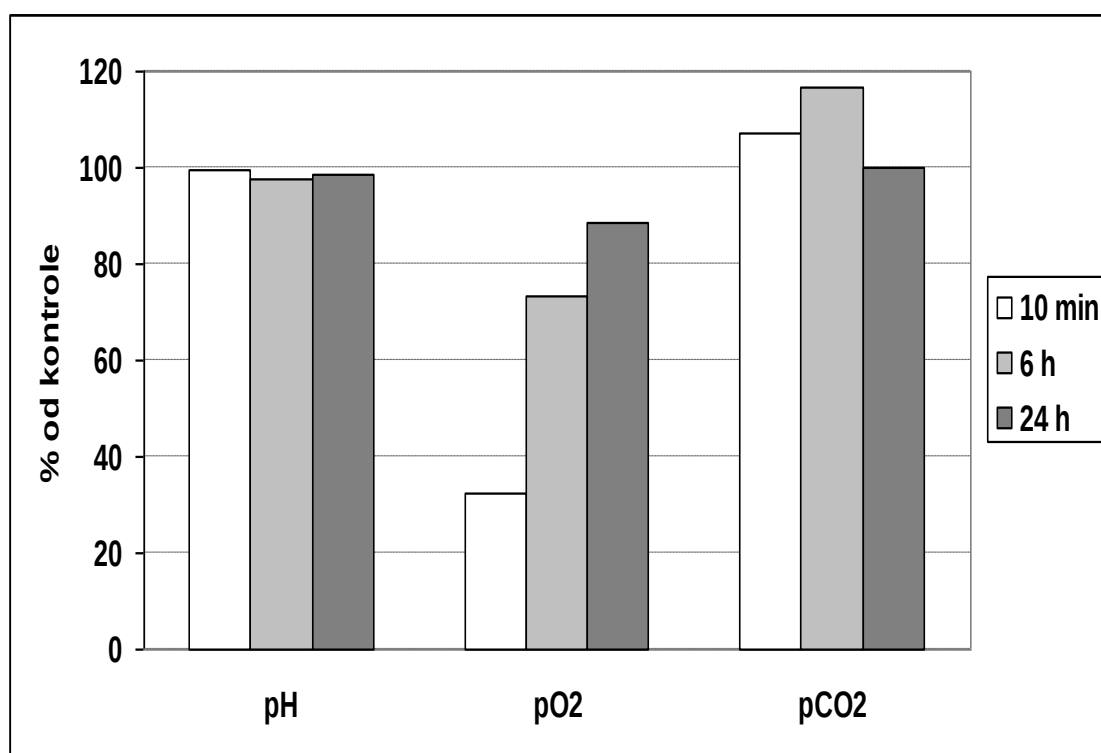
Ацидо-базни статус артеријске крви пацова третирањих малатионом (1 LD₅₀) у току двадесет четири сата (24 h) од момента интоксикације приказан је у Табели 5.6.

Табела 5.6. Ацидо-базни статус крви пацова третирањих малатионом (1 LD₅₀ po) 10 минута, 6 и 24 сата после интоксикације

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$	
	cBase (mmol/l)	cHCO ₃ ⁻ (mmol/l)
контрола	- 1,54 ± 0,60	22,36 ± 1,38
малатион		
10 минута	-5,28 ± 1,49***	17,96 ± 1,38***
6 h	- 5,45 ± 2,04***	14,72 ± 3,11***
24 h	-3,61 ± 1,41**	17,27 ± 5,71
Значајност (p) у односу на контролну групу	**p<0,01 ***p<0,001	***p<0,001

На основу вредности концентрације базног пуферског система и концентрације слободних бикарбонатних јона у контролној групи, може се закључити да почетне, базалне вредности у испитиваној групи указују на ацидозу благог степена. Примена малатиона доводи до статистички значајног продубљења ацидозе која се региструје континуирано током 24 сата. Пад концентрације слободних бикарбонатних јона је у првој фази значајан али не достиже ниво статистички значајне разлике 24 сата после тровања.

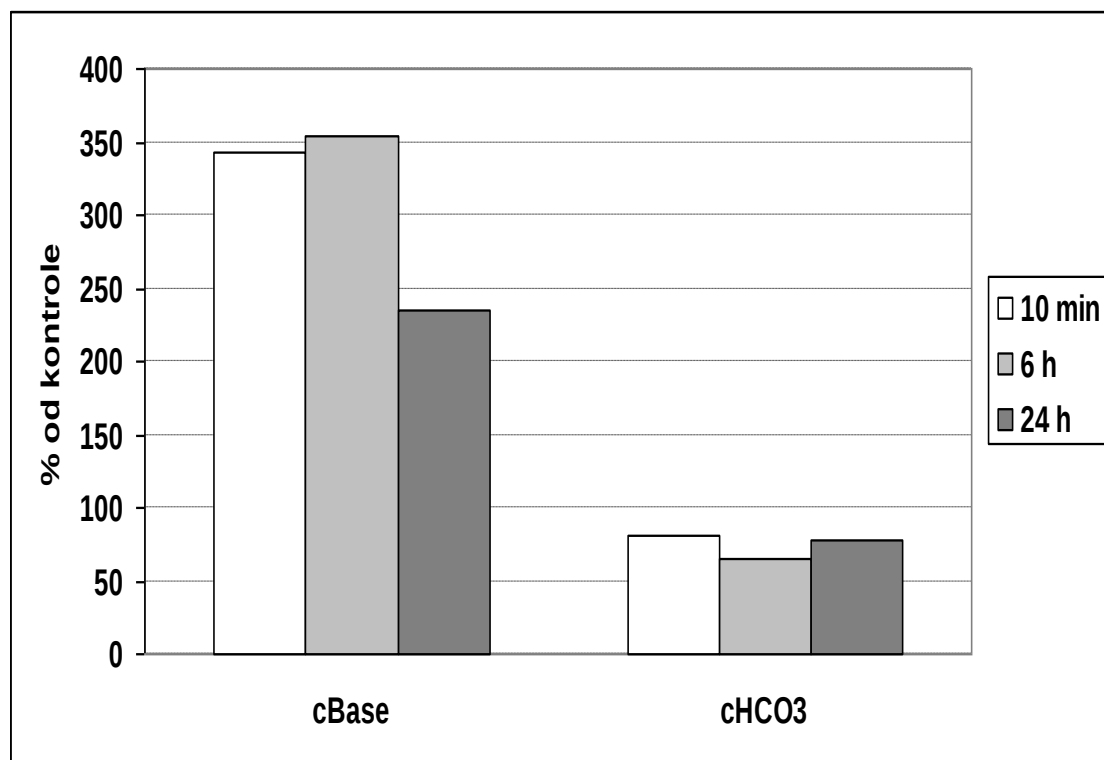
Динамика (% промена у односу на контролне вредности) гасних параметара крви пацова третираних малатионом (1 LD₅₀) приказана је на Слици бр.9 .



Слика бр. 9. Динамика (% промена у односу на контролне вредности) гасних параметара крви пацова 10 минута, 6 и 24 сата после примене малатиона

Детаљни резултати приказани су у Табели 4.2. Поред значајног али (изражено у %) малог пада рН вредности (6 сати после интоксикације), региструје се драматичан пад рО₂ посебно 10 минута после примене малатиона. Сви праћени параметри се приближавају контролним вредностима 24 сата после тровања.

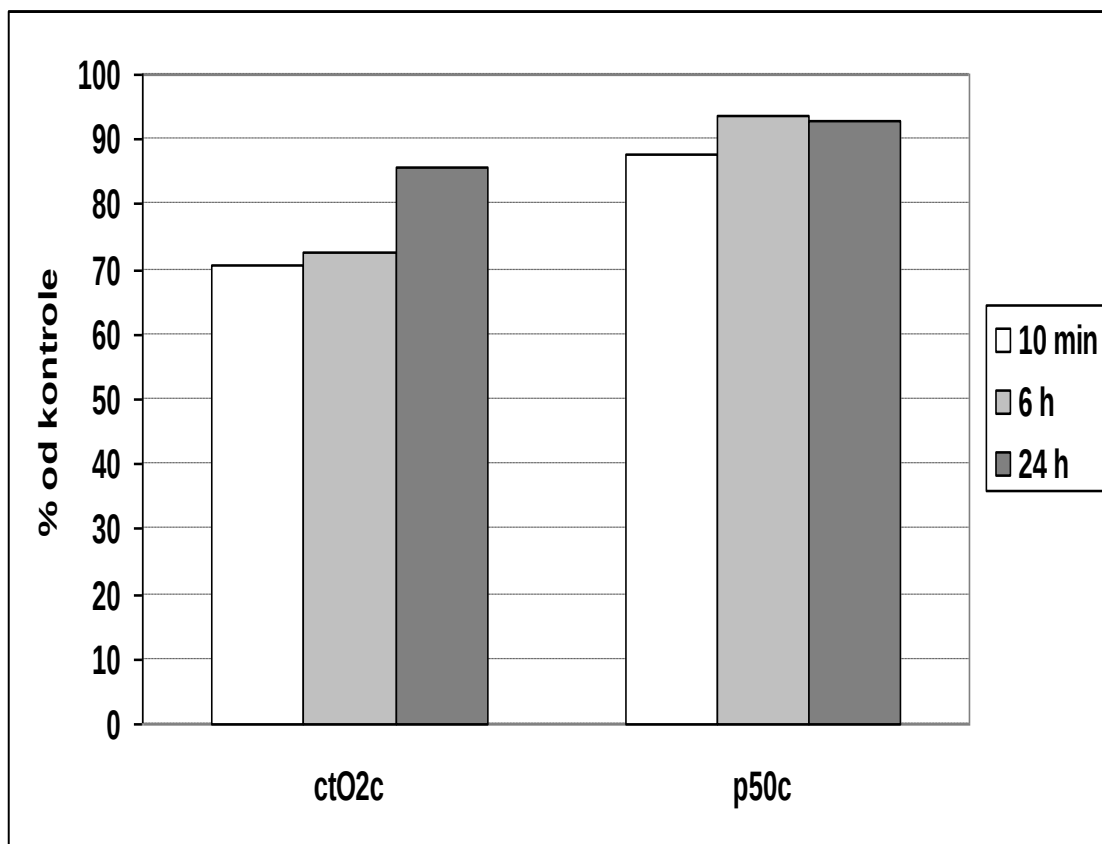
Динамика (% промена у односу на контролне вредности) ацидо-базног статуса крви пацова третираних малатионом (1 LD₅₀) приказана је на Слици бр. 10.



Слика бр. 10. Динамика (% промена у односу на контролне вредности) ацидо-базног статуса крви пацова 10 минута, 6 и 24 сата после примене малатиона

Детаљни резултати приказани су у Табели 4.2. Регистровано је вишеструко продубљење ацидозе током свих 24 сата а ови поремећаји су праћени нижим концентрацијама слободних бикарбонатних јона. Поремећаји су најизраженији 6 сати после примене малатиона.

Динамика (% промена у односу на контролне вредности) оксигеног статуса крви пацова третираних малатионом (1 LD₅₀) приказана је на Слици бр.11.

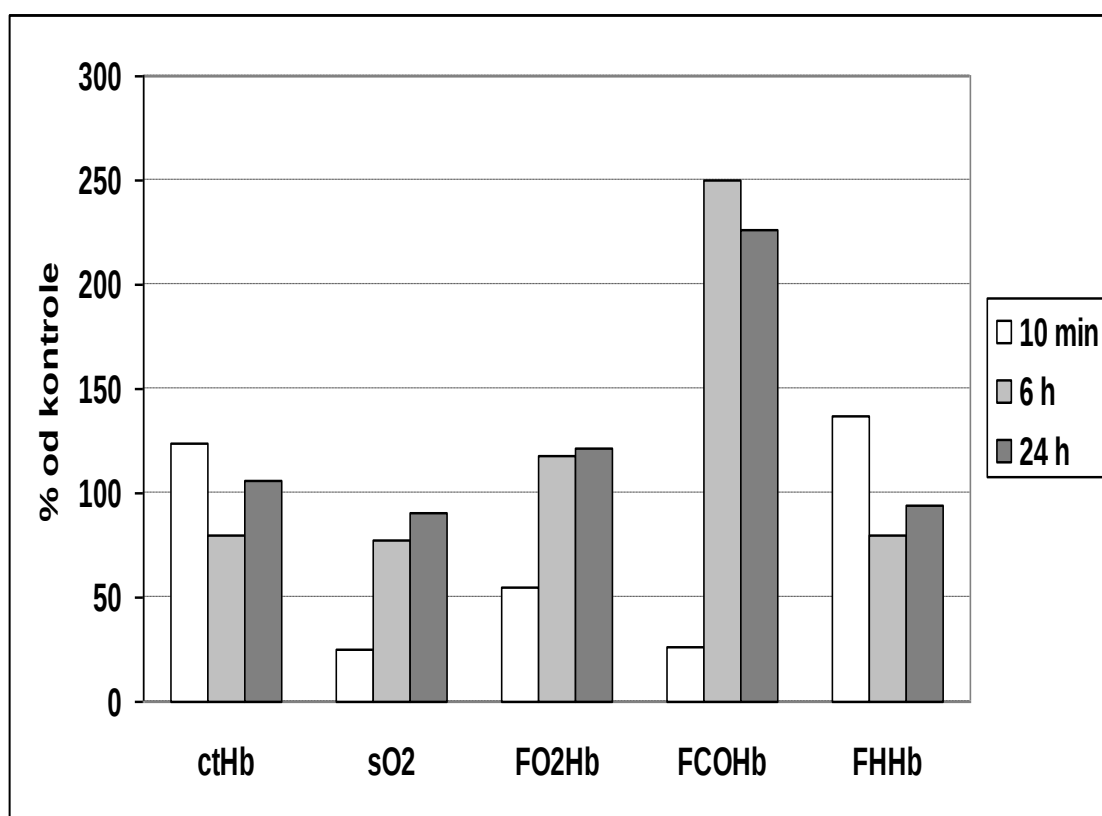


Контрола = 100%

Слика бр. 11. Динамика (% промена у односу на контролне вредности) оксигеног статуса крви пацова 10 минута, 6 и 24 сата после примене малатиона

Детаљни резултати приказани су у Табели 4.5.. Праћени параметри нити у једном интервалу не одступају значајно од контролних вредности а распон одступања износи 10-30%.

Динамика (% промена у односу на контролне вредности) оксиметријских параметара крви пацова третираних малатионом (1 LD₅₀) приказана је на Слици бр. 12.

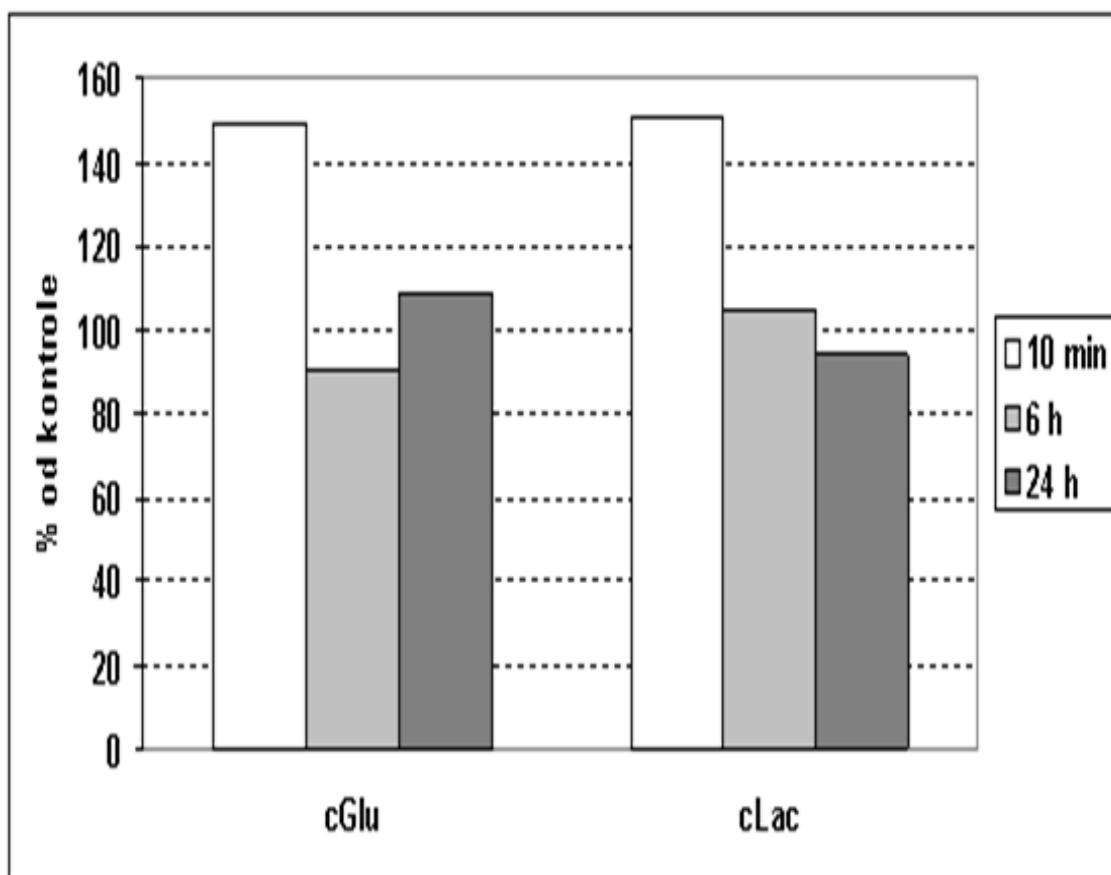


Контрола = 100%

Слика бр.12. Динамика (% промена у односу на контролне вредности) оксиметријских параметара крви пацова 10 минута, 6 и 24 сата после примене малатиона

Детаљни резултати приказани су у Табели 12. Битна одступања праћених параметара у односу на контролне вредности регистрована су у случају sO₂ (пад, посебно 10 минут) и FCOHb (пад у 10 минуту а затим значајан пораст вредности 6 сати после интоксикације).

Динамика (% промена у односу на контролне вредности) метаболичких параметара крви пацова третираних малатионом (1 LD₅₀) приказана је на Слика бр. 13..



Контрола = 100%

Слика бр.13. Динамика (% промена у односу на контролне вредности) метаболличких параметара крви пацова 10 минута, 6 и 24 сата после примене малатиона

Детаљни резултати приказани су у Табели 4.4. Јасно се уочавају значајна одступања концентрације глукозе и млечне киселине (у односу на контролне вредности) 10 минута после тровања малатионом. Карактеристичан је истовремени пораст, приближно истог интензитета, оба параметра. Концентрације билирубина, због апсолутне неконзистенције резултата, нису приказане нити су коментарисане.

5.2. Утицај различитих доза натријум бикарбоната на гасне параметре крви пацова

У литератури је већ проучаван временски – завистан ток метаболичких промена у крви пацова после примене натријум бикарбоната. Утврђено је да се 10 минута после примене натријум бикарбоната, јављају статистички значајне промене у смислу развоја алкалозе па је овај временски интервал изабран за процену дејства различитих доза натријум бикарбоната. Гасни параметри артеријске крви пацова третираних различитим дозама натријум бикарбоната (1-4 mmol/L) приказани су у Табелама 4.7,4.8,4.9,4.10.

Гасни параметри артеријске крви пацова третираних различитим дозама натријум бикарбоната NaHCO_3 (1-4 mmol/kg *ip*) приказани су у Табели 5.7.

Табела 5.7. Гасни параметри артеријске крви пацова третираних различитим дозама натријум бикарбоната NaHCO_3 (mmol/kg *ip*) 10 минута после примене

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$		
	pH	pO ₂ (mmHg)	pCO ₂ (mmHg)
контрола	7,29 ± 0,09	76,7 ± 16,07	44,61 ± 10,90
NaHCO_3			
1	7,32 ± 0,35	65,58 ± 14,99	47,92 ± 15,60
2	7,36 ± 0,83	60,17 ± 10,52	46,60 ± 6,04
3	7,40 ± 0,07*	56,4 ± 12,30*	50,34 ± 8,20
4	7,42 ± 0,10*	55,57 ± 11,60*	53,10 ± 10,52
Значајност (p) у односу на контролну групу	*p<0,05	*p<0,05	p>0,05 n.s.

Легенда : *t = 2,36; p < 0,05 у односу на контролну групу

Примена растућих доза натријум бикарбоната (NaHCO_3) доводи до пропорцијалног раста pH вредности и пропорцијалног снижења pO_2 вредности уз релативно благи пораст вредности pCO_2 . Статистички значајне разлике прва два параметра (контролна група и третиране групе) добијене су тек применом две (2) највеће испитиване дозе натријум бикарбоната (3 и 4 mmol/L).

Оксиметријски параметри артеријске крви пацова третираних различитим дозама натријум бикарбоната NaHCO_3 (1-4 mmol/kg *ip*) дати су Табели 5.8.

Табела 5.8. Оксиметријски параметри артеријске крви пацова третираних различитим дозама натријум бикарбоната NaHCO_3 (mmol/kg *ip*) 10 минута после примене

ГРУПЕ	$\bar{X} \pm SD$				
	ctHb (g/dL)	sO ₂ (%)	FO ₂ Hb (%)	FCOHb (%)	FHHb (%)
контрола	11,40 ± 3,80	91,31±17,81	42,62±16,77	1,20 ± 1,03	55,78±18,01
NaHCO_3					
1	10,38 ± 4,04	90,35±24,98	61,35±22,25	2,92 ± 1,62	34,67±24,41
2	14,82 ± 2,47	88,60 ± 8,50	39,85±8,12	1,08 ± 0,49	58,58 ± 8,72
3	14,22 ± 1,82	87,27±19,43	43,27±18,49	1,15 ± 1,08	54,95±19,79
4	9,35 ± 2,29	86,31±27,70	55,82±25,41	2,63 ± 1,66	40,72±27,48
Значајност (p) у односу на контролну групу	p>0,05 n.s.	p>0,05 n.s.	p>0,05 n.s.	p>0,05 n.s.	p>0,05 n.s.

Није дошло до статистички значајних промена оксиметријских параметара крви пацова чак ни после примене највећих испитиваних доза NaHCO_3 (3 и 4 mmol/kg).

Метаболички параметри артеријске крви пацова третираних различитим дозама натријум бикарбоната NaHCO_3 (1-4 mmol/kg *ip*) приказани су у Табели 5.9.

Табела 5.9. Метаболички параметри артеријске крви пацова третираних различитим дозама NaHCO_3 (mmol/kg ip) 10 минута после примене

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$		
	cGlu (mmol/l)	cLac (mmol/l)	ctBil ($\mu\text{mol/l}$)
контрола	4,08 $\pm$ 0,76	5,62 $\pm$ 1,41	0,17 $\pm$ 0,40
NaHCO_3			
1	3,52 $\pm$ 0,65	5,38 $\pm$ 1,88	0,17 $\pm$ 0,40
2	3,78 $\pm$ 0,94	6,21 $\pm$ 0,82	-
3	4,18 $\pm$ 2,77	5,93 $\pm$ 1,10	-
4	3,90 $\pm$ 1,90	5,32 $\pm$ 1,89	-
Значајност (p) у односу на контролну групу	p>0,05 n.s.	p>0,05 n.s.	p>0,05 n.s.

Вредности глукозе и лактата, као битних метаболичких параметара, нису битно (статистички значајно) промењене применом било које дозе NaHCO_3 . Недостатак података у колони укупни билирубин (ctBil) последица је немогућности опреме (гасни анализатор) да израчуна тражени параметар крви.

Оксигени статус артеријске крви пацова третираних различитим дозама NaHCO_3 (1-4 mmol/kg ip) приказан је у Табели 5.10.

Табела 5.10. Оксигени статус артеријске крви пацова третирањих различитим дозама натријум бикарбоната NaHCO_3 (mmol/kg ip) 10 минута после примене

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$	
	ctO _{2c} (Vol %)	p50 _c (mmHg)
контрола	6,66 ± 2,18	44,81 ± 5,80
NaHCO_3		
1	7,16 ± 0,40	45,93 ± 9,04
2	8,33 ± 1,72	50,03 ± 5,96
3	8,46 ± 3,22	44,03 ± 2,28
4	6,86 ± 2,14	44,79 ± 6,66
Значајност (p) у односу на контролну групу	p>0,05 n.s.	p>0,05 n.s.

Параметри оксигеног статуса крви пацова показују одсуство дозно-зависног ефекта натријум бикарбоната NaHCO_3 и нехомогеног су карактера. На то указују такође и вредности добијене после примене највеће дозе натријум бикарбоната NaHCO_3 које су блиске контролним вредностима.

Ацидо-базни статус крви пацова третирањих различитим дозама NaHCO_3 (1-4 mmol/kg ip) приказан је у Табели 5.11.

Табела 5.11. Ацидо-базни статус артеријске крви пацова третирањих различитим дозама**NaHCO₃ (mmol/kg ip) 10 минута после примене**

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$	
	cBase (mmol/l)	cHCO ₃ ⁻ (mmol/l)
контрола	- 1,54 ± 0,60	22,36 ± 1,38
NaHCO ₃		
1	-0,23 ± 1,55	24,35 ± 4,04
2	1,60 ± 3,43	25,00 ± 3,41
3	4,45 ± 1,6***	27,05 ± 2,48**
4	4,95 ± 2,01***	28,55 ± 3,63**
Значајност (p) у односу на контролну групу	***p<0,001	**p<0,01

На основу вредности концентрације базног пуферског система – cBase и концентрације слободних бикарбонатних јона – cHCO₃ у контролној групи, може се закључити да испитивани пацови поседују елементе који указују на ацидозу умереног степена. Две највеће примењене дозе натријум бикарбоната доводе до стања умерене алкалозе (параметри су статистички значајно различити у односу на контролну групу).

5.3. Заштитни ефекти различитих доза натријум бикарбоната код тровања пацова малатионом (1,3 LD₅₀)

Претходни резултати (Табеле 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10.) су нас уверили да посебно две највеће дозе натријум бикарбоната у неким сегментима праћених параметара (посебно ацидо-базни статус) битно утичу на ове параметре односно изазивају жељену метаболичку алкалозу. Стога је, како би се наставак експеримента и испитивања могао наставити са оптималном дозом натријум бикарбоната испитиван је заштитни ефекат различитих доза натријум бикарбоната у пацова третирањих са апсолутно смртном дозом 1,3 LD₅₀ малатиона .

Ова доза изазива смрт у свих затрованих пацова и често се користи за проучавање ефикасности антидота у акутним интоксикацијама инсектицидима или нервним бојним отровима. Обзиром на израчунату LD₅₀ малатиона (621,6 mg/kg), прорачуната доза (621,6 x 1,3 = 808,1 mg/kg) је коришћена кад год је то било потребно у наставку испитивања.

Испитивањем различитих моларних концентracија NaHCO₃, односно дозне зависности на преживљавање група од по 5 испитиваних пацова у укупном броју од 20 испитиваних експерименталних животиња при акутном пероралном тровању са 1,3 LD₅₀ малатиона (808,08 mg/kg) добили смо следеће резултате:

Табела 5.12. Заштитни ефекти различитих доза натријум бикарбоната NaHCO₃ (1-4 mmol/kg ip) после пероралне примене малатиона у дози од 1,3 LD₅₀

ТРЕТМАНИ	БРОЈ ЖИВОТИЊА У ГРУПИ (n = 5)	
	угинуле	преживеле
Малатион + NaHCO ₃ (1)	4	1
Малатион + NaHCO ₃ (2)	3	2
Малатион + NaHCO ₃ (3)	1	4
Малатион + NaHCO ₃ (4)	4	1
Упоређивање минималне и максималне заштитне моћи: Мал + NaHCO ₃ (1) : Мал + NaHCO ₃ (3)	$\chi^2 = 1,6$ df =3 n.s.	

N = 20 животиња ; MAL - малатион

Заштитни ефекти натријум бикарбоната NaHCO₃ процењивани су 24 сата после примене NaHCO₃ и малатиона. Применом NaHCO₃ у дози од 3 mmol/kg постигнут је највећи заштитни ефект (80% преживелих животиња). Ипак, поређењем овог ефекта са ефектом који је добијен после примене најмање дозе NaHCO₃ (1mmol/kg) није показана статистички значајна разлика (Табела 4.12.). Како највећа примењена доза NaHCO₃ (4 mmol/kg) није испољила било какав заштитни ефект, у даљем току испитивања је коришћена искључиво доза NaHCO₃ од 3 mmol/kg.

Иако нема статистички значајне разлике у преживљавању између група, најбољи заштитни ефекат постигнут је у групи МАЛ+NaHCO₃ (3 mmol/kg) и пораст токсичног ефекта у групи МАЛ+NaHCO₃ (4 mmol/kg) опредељује нас да у даљем току испитивања користимо NaHCO₃ у дози од 3 mmol/kg.

5.4. Процена могућности корекције метаболичке ацидозе изазване 1 LD₅₀ малатиона (po) применом натријум бикарбоната NaHCO₃ (3 mmol/L ip.)

Процена могућности антагонизовања метаболичке ацидозе изазване малатионом извршена је применом натријум бикарбоната NaHCO₃ у моменту максимално изражене алкалозе (10 минута после давања NaHCO₃). Процена је извршена регистрацијом селективних параметара који су од највећег значаја за увид у ацидо-базни статус експерименталних животиња.

Гасни параметри крви пацова интоксигираних малатионом *per se* или после комбиноване примене натријум бикарбоната NaHCO₃ и малатиона приказани у Табели 5.13.

Табела 5.13. Гасни параметри крви пацова третираних са натријум бикарбонатом NaHCO₃ (3 mmol/L ip.) и са 1 LD₅₀ малатиона (po) или са њиховом комбинацијом 10 минута после примене

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$		
	pH	pO ₂ (mmHg)	pCO ₂ (mmHg)
контрола	7,29 ± 0,09	76,70 ± 16,07	44,61 ± 10,90
NaHCO ₃	7,40 ± 0,07*	56,40 ± 12,30*	50,34 ± 8,20
малатион	7,25 ± 0,04	24,82 ± 11,02***	47,78 ± 5,32
NaHCO ₃ + малатион	7,34 ± 0,02**	26,10 ± 6,45***	44,00 ± 6,78
Значајност (p) у односу на контролну групу	*p<0,05 **p<0,01	*p<0,05 ***p<0,001	p>0,05 n.s.

Почетна ацидоза изазвана применом малатиона (статистички незначајан поремећај у односу на контролну групу) у потпуности се антагонизује једнократном применом NaHCO_3 (погледати рН вредности).

Када је реч о вредностима pO_2 , изражени пад вредности овог параметра регистрован у групи пацова трованих малатионом, није могао бити коригован применом NaHCO_3 .

Ацидо-базни статус крви пацова интоксигираних малатионом *per se* или после комбиноване примене NaHCO_3 и малатиона приказан је у Табели 5.14.

Табела 5.14. Ацидо-базни статус крви пацова третираних са натријум бикарбонатом NaHCO_3 (3 mmol/l ip.) и са 1 LD₅₀ малатиона (po) или са њиховом комбинацијом 10 минута после примене

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm \text{SD}$	
	cBase (mmol/l)	cHCO ₃ ⁻ (mmol/l)
контрола	- 1,54 ± 0,60	22,36 ± 1,38
NaHCO_3	4,45 ± 1,6***	27,05 ± 2,48**
малатион	-5,28 ± 1,49***	17,96 ± 1,38***
NaHCO_3 + малатион	- 1,68 ± 3,00 ⁺	21,32 ± 2,04 ⁺
Значајност (p) у односу на (*) контролну групу (+) малатион	***p<0,001 ⁺ p<0,05	**p<0,01 ***p<0,001 ⁺ p<0,05

На основу вредности концентрације базног пуферског система у групи NaHCO_3 + Малатион може се закључити да NaHCO_3 у потпуности антагонизује ацидозу изазвану малатионом. Регистровањем концентрације слободних бикарбонатних јона уочава се сличан тренд али без потврђене статистички значајне разлике између група NaHCO_3 + Малатион и Малатион.

5.5. Утицај различитих антидотских третмана на гасне параметре крви пацова трованих апсолутно смртном дозом (1,3 LD₅₀) малатиона, 24 сата после интоксикације

Гасни параметри крви пацова третирањих малатионом (1,3 LD₅₀) и различитим антидотским комбинацијама 24 сата после третмана приказани су у Табели 4.15.

Табела 5.15. Гасни параметри крви пацова третирањих малатионом (1,3 LD₅₀) и различитим антидотским комбинацијама 24 сата после третмана

ГРУПЕ	$\bar{X} \pm SD$		
	pH	pO ₂ (mmHg)	pCO ₂ (mmHg)
MAL+ATR	7,20 ± 0,02	33,18 ± 7,20	47,44 ± 5,57
MAL+ATR+NaHCO₃	7,26 ± 0,02	26,25 ± 10,16	46,15 ± 5,76
MAL+PAM-2	7,27 ± 0,03	20,51 ± 3,10	47,46 ± 5,47
MAL+PAM-2+NaHCO₃	7,26 ± 0,06	21,61 ± 4,78	49,48 ± 8,33
MAL+ATR+PAM-2+DZP	7,21 ± 0,17	30,43 ± 10,53	39,01 ± 16,18
MAL+ATR+PAM-2+DZP+NaHCO₃	7,19 ± 0,04	32,63 ± 14,54	36,21 ± 7,98
Значајност (p) у односу на групу (MAL+ATR)	(ANOVA) n.s.	(ANOVA) n.s.	(ANOVA) n.s.

Дозе : MAL (малатион, 1,3 LD₅₀ po); ATR (атропин, 10 mg/kg im); NaHCO₃ (3 mmol/kg ip), PAM-2 (10 mg/kg im); DZP (диазепам, 5 mg/kg im)

Поређење вредности група третирањих различитим антидотским комбинацијама изведено је са групом (MAL+ATR). Ово је учињено из разлога што је терапија тровања ОФ инсектицидима превасходно базирана на примени атропина. Независно од примењене терапије, вредности праћених параметара у свим групама су блиске и не достижу ниво статистичке значајности у односу на поредбену групу. У односу на вредности контролне групе (види Табелу 4.15.), pH вредности указују на знаке релативне ацидозе што је праћено статистички значајно нижим (p<0,001) вредностима pO₂.

Ацидо-базни статус крви пацова третирањих малатионом (1,3 LD₅₀) и различитим антидотским комбинацијама 24 сата после третмана приказан је у Табели 5.16.

Табела 5.16. Ацидо-базни статус крви пацова третираних малатионом (1,3 LD₅₀) и различитим антидотским комбинацијама 24 сата после третмана

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$	
	cBase (mmol/l)	cHCO ₃ ⁻ (mmol/l)
MAL+ATR	- 8,47 ± 2,77	15,48 ± 1,58
MAL+ATR+NaHCO₃	- 5,57 ± 1,84	17,80 ± 0,96
MAL+PAM-2	- 5,28 ± 2,11	17,80 ± 1,43
MAL+PAM-2+NaHCO₃	- 6,83 ± 4,29	18,26 ± 2,97
MAL+ATR+PAM-2+DZP	- 9,29 ± 3,17	14,09 ± 4,51
MAL+ATR+PAM-2+DZP+NaHCO₃	- 9,50 ± 2,58	15,02 ± 3,25
Значајност (p) у односу на групу (MAL+ATR)	(ANOVA) n.s.	(ANOVA) n.s.

Дозе : MAL (малатион, 1,3 LD₅₀ po); ATR (атропин, 10 mg/kg im); NaHCO₃ (3 mmol/kg ip), PAM-2 (10 mg/kg im); DZP (диазепам, 5 mg/kg im)

Резултати приказани у Табели 4.16. јасно указују на присуство умерене ацидозе (негативне вредности базног ексцеса и ниже концентрације слободних бикарбонатних јона у односу на контролне вредности, (Табела 15). Увођење бикарбоната у терапију нема утицаја на ефекте других примењених антидота. Погоршани ацидо-базни статус у односу на резултате групе третиране малатионом пер се (1 LD₅₀, види Табелу 15) вероватно се може протумачити као последица примене нешто веће дозе малатиона у овим испитивањима (1,3 LD₅₀).

Оксигени статус крви пацова третираних малатионом (1,3 LD₅₀) и различитим антидотским комбинацијама 24 сата после третмана приказан је у Табели 5.17.

Табела 5.17. Оксигени статус крви пацова третираних малатионом (1,3 LD₅₀) и различитим антидотским комбинацијама 24 сата после третмана

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$	
	ctO _{2c} (Vol %)	p50 _c (mmHg)
MAL+ATR	6,61 ± 2,00	44,82 ± 2,23
MAL+ATR+NaHCO₃	4,87 ± 2,40	43,67 ± 6,08
MAL+PAM-2	3,66 ± 0,74	41,43 ± 3,96
MAL+PAM-2+NaHCO₃	3,95 ± 1,26	41,61 ± 3,70
MAL+ATR+PAM-2+DZP	4,23 ± 2,76	47,03 ± 4,21
MAL+ATR+PAM-2+DZP+NaHCO₃	4,58 ± 0,59	47,43 ± 3,81
Значајност (p) у односу на групу (MAL+ATR)	(ANOVA) n.s.	(ANOVA) n.s.

Дозе: MAL (малатион, 1,3 LD₅₀ po); ATR (атропин, 10 mg/kg im); NaHCO₃ (3 mmol/kg ip), PAM-2 (10 mg/kg im); DZP (диазепам, 5 mg/kg im)

Није регистрована значајна разлика између ефеката у групама третираних различитим комбинацијама антидота. Вредности праћених параметара блиске су вредностима које су добијене у контролној групи.

Оксиметријски параметри крви пацова третираних малатионом (1,3 LD₅₀) и различитим антидотским комбинацијама 24 сата после третмана приказани су у Табели 5.18.

Табела 5.18. Оксиметријски параметри крви пацова третираних малатионом (1,3 LD₅₀) и различитим антидотским комбинацијама 24 сата после третмана

ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$				
	ctHb (g/dL)	sO ₂ (%)	FO ₂ Hb (%)	FCOHb (%)	FHHb (%)
MAL+ATR	15,65 ± 1,26	30,14±9,42	30,03±9,53	0,00 ± 0,43	69,55±9,35
MAL+ATR+NaHCO₃	15,08 ± 2,41	24,53±12,79	24,53±12,80	-0,30 ± 0,49	75,50±12,95
MAL+PAM-2	14,18 ± 0,78	15,18±6,09	15,20±6,02	-0,56 ± 0,36	85,10±6,42
MAL+PAM-2+NaHCO₃	14,78 ± 0,97	17,23 ± 7,02	17,26±6,92	-0,43 ± 0,38	82,90 ± 7,35
MAL+ATR+PAM-2+DZP	12,33 ± 2,14	24,70 ± 15,62	24,75±15,73	-0,40 ± 0,41	75,46 ± 15,66
MAL+ATR+PAM-2+DZP+NaHCO₃	13,88 ± 3,25	20,08 ± 11,33	20,10±11,41	-0,28 ± 0,51	79,90 ± 11,37
Значајност (p) у односу на групу (MAL+ATR)	(ANOVA) n.s.	(ANOVA) n.s.	(ANOVA) n.s.	(ANOVA) n.s.	(ANOVA) n.s.

Дозе : MAL (малатион, 1,3 LD₅₀ po); ATR (атропин, 10 mg/kg im); NaHCO₃ (3 mmol/kg ip), PAM-2 (10 mg/kg im); DZP (диазепам, 5 mg/kg im)

Није добијена статистички значајна разлика између вредности група које су третиране различитим антидотским комбинацијама. Региструју се упадљиво ниже (статистички значајне, $p < 0,001$) вредности сатурације крви кисеоником у односу на контролну групу (види Табелу 4.18) што је праћено и нижим вредностима фракције оксигемоглобина (FO₂Hb) у односу на вредности контролних јединки.

Метаболички параметри крви пацова третираних малатионом (1,3 LD₅₀) и различитим антидотским комбинацијама 24 сата после третмана приказани су у Табели 5.19.

Табела 5.19. Метаболички параметри крви пацова третирањих малатионом (1,3 LD₅₀) и различитим антидотским комбинацијама 24 сата после третмана

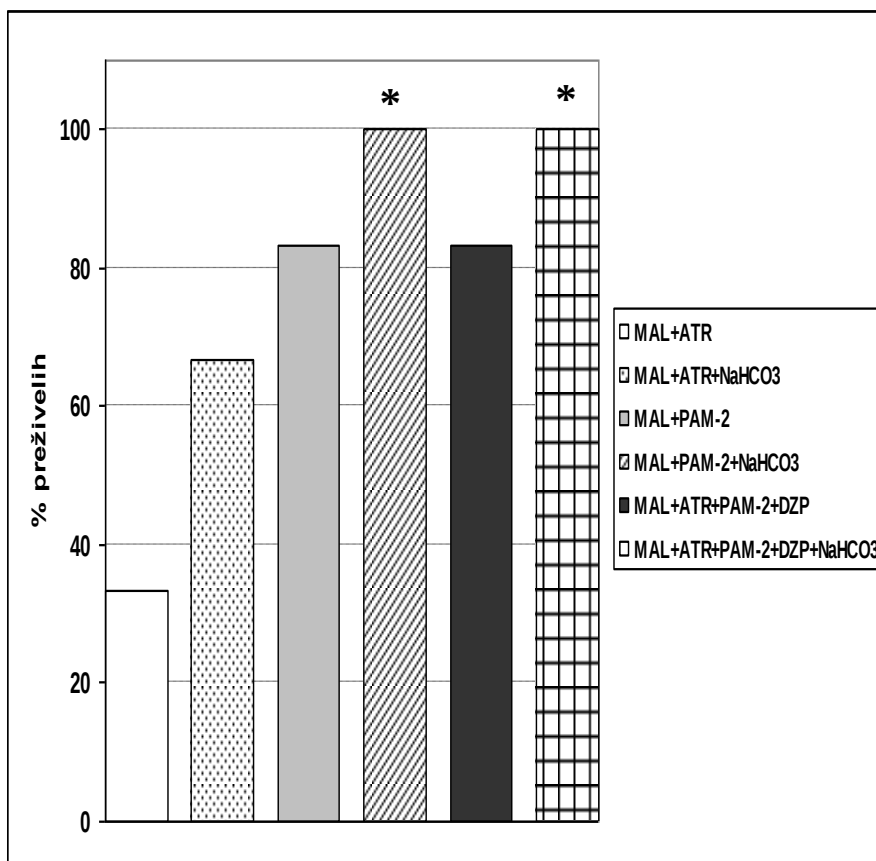
ГРУПЕ	$\bar{x} \pm SD$		
	cGlu (mmol/l)	cLac (mmol/l)	ctBil (μ mol/l)
MAL+ATR	5,46 $\pm$ 0,85	8,75 $\pm$ 1,45	4,55 $\pm$ 8,23
MAL+ATR+NaHCO ₃	6,26 $\pm$ 0,83	8,31 $\pm$ 1,46	4,62 $\pm$ 5,92
MAL+PAM-2	4,56 $\pm$ 0,66	6,36 $\pm$ 1,20	2,00 $\pm$ 2,09
MAL+PAM-2+NaHCO ₃	4,96 $\pm$ 0,89	8,16 $\pm$ 1,24	2,16 $\pm$ 1,32
MAL+ATR+PAM-2+DZP	4,33 $\pm$ 1,64	8,98 $\pm$ 5,59	4,83 $\pm$ 8,25
MAL+ATR+PAM-2+DZP+NaHCO ₃	4,88 $\pm$ 2,00	5,11 $\pm$ 1,51	2,00 $\pm$ 4,89
Значајност (p) у односу на групу (MAL+ATR)	(ANOVA) n.s.	(ANOVA) n.s.	(ANOVA) n.s.

Дозе : MAL (малатион, 1,3 LD₅₀ po); ATR (атропин, 10 mg/kg im); NaHCO₃ (3 mmol/kg ip), PAM-2 (10 mg/kg im); DZP (диазепам, 5 mg/kg im)

Резултати приказани у Табели 4.19 указују да различите комбинације антидота испољавају сличан ефект на вредности праћених параметара. У односу на контролну групу (види Табелу 5.19) региструју се, генерално, нешто веће концентрације млечне киселине у већини група.

5.6. Заштитни ефекти антидота примењених *per se* или у комбинацији са NaHCO₃ у пацова третирањих са апсолутно леталном дозом (1,3 LD₅₀) малатиона

На Слици бр. 14. приказани су заштитни ефекти антидота примењених *per se* или у комбинацији са NaHCO₃ у пацова третирањих са 1,3 LD₅₀ малатиона.

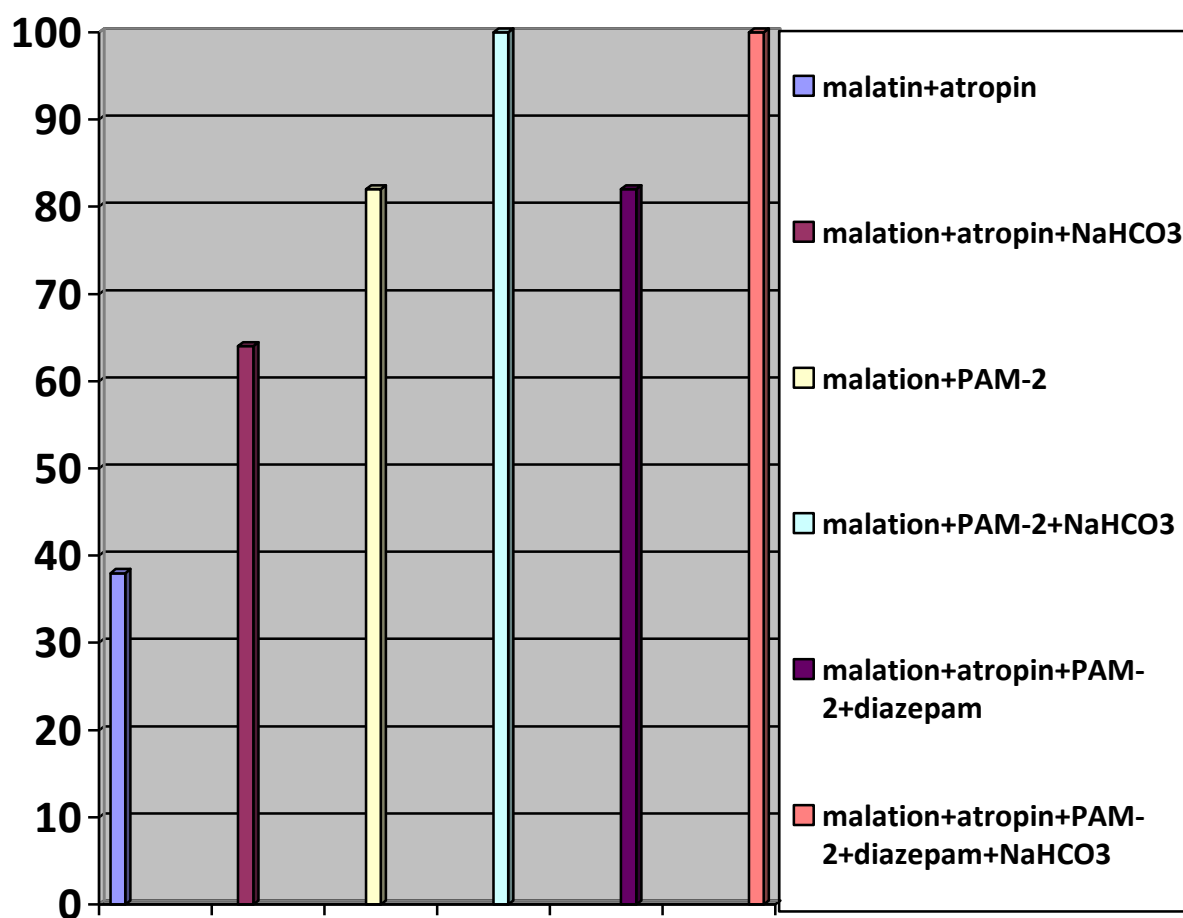


* $p < 0,05$ у односу на групу (MAL+ATR)

Дозе: MAL (малатион, 1,3 LD₅₀ po); ATR (атропин, 10 mg/kg im); NaHCO₃ (3 mmol/kg ip), PAM-2 (10 mg/kg im); DZP (диазепам, 5 mg/kg im)

Слика бр. 14. Заштитни ефекти антидота примењених *пер се* или у комбинацији са NaHCO₃ у пацова третираних са 1,3 LD₅₀ малатиона

Примена атропина обезбеђује преживљавање приближно 30 % животиња трованих апсолутно смртном дозом малатиона. Комбинована примена атропина и NaHCO₃ у раној фази интоксикације малатионом побољшава заштитни ефект за 2 пута. Даље, минимално побољшање заштитних ефеката се може регистровати у групама које су третиране пуном антидотском терапијом (додатак реактиватора ChE PAM-2 и/или DZP). Најбољи (максимални) заштитни ефект добијен је у групама које су поред стандардне антидотске терапије добиле и NaHCO₃.



Дозе :

- атропин (10 mg/kg *im.*)
- ПАМ-2 (10 mg/kg *im.*)
- дизепам (5 mg/kg *im.*)
- NaHCO₃ (3mmol/L *ip.*)

1. Т тест пропорција (MAL+ATR : MAL+ПАМ-2+NaHCO₃ – $p < 0,05$)
2. Т тест пропорција (MAL + ATR : MAL+ATR+ПАМ-2+DZP +NaHCO₃ – $p < 0,05$)

Слика бр. 15. Графички приказ заштитних ефеката антидота примењених *per se* или у комбинацији са NaHCO₃ (3mmol/L *ip*) у пацова третираних са 1,3 LD₅₀ малатиона

VI. ДИСКУСИЈА

Различите формулације малатиона (од 0,5 до 95% активне материје) користе се у медицини за ерадикацију ектопаразита и ваши главе и лица као и за контролу популације инсеката у комуналној хигијени.

Пре масовног тровања људи малатионом (Aldridge et al., 1979), на основу експерименталних података (углавном глодари), сматрало се да су комерцијалне формулације малатиона слабо токсичне. У бројним студијама које су изведене на пацовима утврђене LD₅₀ вредности малатиона кретале су се у распону од 1000-8000 mg/kg *p.o.* (Frawley, 1957; Murphy, 1959; Pellegrini and Santi, 1972). Супротно томе, у неким другим студијама, изведеним у истом периоду или нешто касније, утврђене средње леталне дозе изомалатиона и неких других онечишћења су се кретале у распону од 80-160 mg/kg *p.o.* (Deuterman and Main, 1966; Umetsu, 1977; Baker, 1978).

Током програма сузбијања маларије у Пакистану 1976. године кориштена је одговарајућа технолошка формулација малатиона. Од 7500 ангажованих људи, који су директно учествовали у акцији запрашивања, регистровано је 2500 случајева тровања уз 5 смртних исхода. Касније анализе су показале да је овако велики број тровања (и смртни исходи) последица онечишћења техничке формулације изомалатионом али и неким другим активним супстанцама (триметил фосфоротиоати).

Ове додатне компоненте, инхибирајући карбоксилестеразе које представљају главни детоксикациони механизам у процесу метаболизма малатиона, условиле су високу токсичност примењене формулације.

Техничка формулација малатиона коју смо користили током целокупног трајања експеримената, упркос високе чистоће (96% малатиона), испољила је релативно високу токсичност после пероралне примене у пацова (621 mg/kg). Ова чињеница, иако индиректно, указује да су у коришћеној формулацији морале бити присутне и супстанце онечишћења будући да је добијена LD₅₀ вредност била у распону горе поменутих вредности (80-8000 mg/kg).

Даљња потврда изнесеног става лежи и у чињеници да је у добро контролисаној студији Aldridge et al., (1979) утврђено следеће: после примене чистог малатиона (више од 99,7% малатиона) ретко се уочавају видљиви знаци токсичности током првих 6 сати интоксикације а највећи број леталних исхода у пацова региструје се тек у периоду од 20-40 сати од ингестије отрова.

У нашој студији то није био случај обзиром на чињеницу да се већина леталних исхода могла регистровати у периоду до 24 сата.

На основу наведеног (а без аналитичких доказа), може се рећи да је у студији рађено са формулацијом која испољава високу токсичност пре свега захваљујући присуству онећишчења.

Преовлађујући став у светској токсиколошкој литератури, која се бави професионалним интоксикацијама ОФ једињењима је, да је присуство значајних концентрација онечишћења, апсолутно нежељено у формулацијама којима су континуирано експонирани ангажовани радници.

Стога се у SAD малатион може на тржишту наћи само у две форме: чист у виду безбојне течности и техничке формулације (смеђо-жуте течности) са садржајем активне материје преко 90%. У Европи се могу наћи техничке формулације са садржајем малатиона већ од 80% (ATSDR, 2003).

Горе поменути подаци указују да је испитивана формулација малатиона испољила акутну токсичност која је блиска токсичности сличних комерцијалних формулација других произвођача па ће стога и сви други испитивани ефекти моћи бити компарирани са већ познатим подацима из наше и светске литературе.

Утвђена радна хипотеза и постављени циљеви испитивања подразумевали су праћење гасних параметара артеријске крви пацова на основу којих би се могао проценити ацидо-базни статус пацова и метаболички поремећаји после примене малатиона, различитих доза натријум бикарбоната датих пер се или у комбинацији са стандардним антидотима. Обзиром да су гасни параметри крви регистровани 10 минута, 6 сати и 24 сата после примене отрова (и/или) антидота) од изузетно велике важности је било установити почетне (базалне-контролне) вредности испитиваних параметара. Стабилне, репродуцибилне, почетне вредности омогућавају прецизан увид у јачину и динамику метаболичких промена изазваних малатионом али и могућност исправљања евентуалних метаболичких промена применом натријум бикарбоната и стандардних антидота. Поред горе наведених чињеница, од изузетне је важности било да контролни нивои праћених параметара буду компарабилни са подацима из домаће и светске литературе.

У раду (Jochem, 2001) дат је приказ битних параметара гасних анализа артеријске крви Wistar пацова мушког пола. Контролна вредност рН износила је 7,4; вредност слободних бикарбонатних јона 27 mmol/L а вредности базног ексцеса (+ 1,5 mmol/L). Ове вредности представљају средње вредности групе од 6 пацова.

У нешто савременијој студији (Quentin et al., 2004) дате су контролне вредности гасних параметара артеријске крви Sprague-Dawley пацова мушког пола. Регистрована рН вредност износила је 7,37 а вредност слободних бикарбонатних јона 27,7 mmol/L. Ове вредности представљају средње вредности групе од 10 пацова.

Упоредјујући ове вредности са вредностима наше контролне групе, евидентно је да су пацови које смо користили током извођења ове студије били у благој ацидози. После почетног сагледавања проблема, повећан је број животиња у контролној групи али то није битно допринело корекцији почетних резултата. Други гасни параметри који су такође испитивани у горе-поменутих студијама (pO_2 ; pCO_2 , sO_2) били су блиски вредностима које смо добили у контролној групи.

Валидност других праћених параметара (нпр. глукоза, билирубин) није могла бити адекватно утврђена обзиром на велику варијабилност публикованих резултата, експериментални дизајн (глукоза одређивана у капиларној крви) и различитост биохемијских процедура које су коришћене за одређивање ових параметара (Stojiljković et al, 2002; Stanojević et al., 2004; Sokolović et al., 2006; Sabo et al., 2010).

Наше коначно уверење је да дискрепанца која постоји између вредности наше контролне групе и физиолошких вредности презентираних у радовима других страних аутора није последица субјективних фактора (технички, људски). Упркос свега, треба истаћи да и резултати ацидо-базног статуса контролне групе (Stefanović et al, 2004; Stefanović et al., 2006) такође указују на присуство благе ацидозе. Овај налаз је у складу са чињеницама да су у наведеним студијама коришћени пацови истог порекла (Фарма ВМА) као што је то био случај у нашој студији, а мерни уређаји (гасни анализатори) били веома сличних карактеристика.

У раније објављеним радовима (Wong et al., 1998; Bajgar et al., 2001; Stefanović et al., 2004; Stefanović et al., 2006), чији је примарни циљ био испитивање терапијске ефикасности натријум бикарбоната у експерименталним тровањима различитим ОФ једињењима и карбаматима, коришћена је доза натријум бикарбоната од 3 mmol/kg. Стиче се утисак да су каснији радови користили одабрану дозу натријум бикарбоната Wonga et al., (1998) без провере терапијске ефикасности већих доза натријум бикарбоната.

Wong et al., (1998) су ову дозу натријум бикарбоната примењивали у пацова интравенским путем за разлику од других, горе поменутих студија, где је натријум бикарбонат апликован интраперитонеално.

Одлука да се у нашој студији користи интраперитонеални пут примене NaHCO_3 пре свега је последица следећих чињеница:

- интравенски пут примене би значајно усложио техничку реализацију испитивања и пролонгирао време извођења студије
- тврдње изнесене у раду Bajgara et al., (2001) да овај пут примене такође обезбеђује делотворност NaHCO_3
- позитивна експериментална искуства и резултати који су добијени у каснијим студијама (Stefanović et al., 2004; Stefanović et al., 2006).

Тврдње изнесене у раду Bajgara et al., (2001) да овај пут примене такође обезбеђује делотворност натријум бикарбоната али и позитивна експериментална искуства и резултати који су добијени у каснијим студијама (Stefanović et al., 2004; Stefanović et al., 2006) само су нам адекватно потврдила нашу експерименталну одлуку.

У нашој студији, у прелиминарној фази испитивања, стога је и испитан утицај већих растућих доза натријум бикарбоната, датог интраперитонеалним путем. Коришћене су дозе од 1; 2; 3 и 4 mmol/kg како би се утврдио не само њихов ефект на ацидо-базни статус пацова већ и њихов утицај на преживљавање пацова трованих апсолутно смртном дозом малатиона (1,3 LD₅₀).

У радовима (Stefanović et al., 2004; Stefanović et al., 2006) испитан је временски-зависан метаболички ефекат дозе NaHCO_3 од 3 mmol/kg. Показано је да се највећи степен алкалозе региструје 10 минута после примене NaHCO_3 а да се вредности праћених параметара приближавају контролним вредностима 20 и 30 минута после примене. Стога је 10 минут изабран као почетни временски маркер за процену метаболичких ефеката NaHCO_3 .

На основу вредности рН, концентрације базног пуферског система (сBase) и концентрације слободних бикарбонатних јона (HCO_3) показано је да две највеће примењене дозе натријум бикарбоната (3 и 4 mmol/kg) узрокују статистички значајну алкалозу. Највећа примењена доза је, у складу са очекивањима, изазвала алкалозу најјачег интензитета али су добијене вредности битних параметара (рН, сBase и HCO_3) биле блиске вредностима добијеним применом дозе натријум бикарбоната од 3 mmol/kg.

Појединачна, једнократна примена свих испитиваних доза натријум бикарбоната у пацова третираних апсолутно смртном дозом малатиона показала је највећу терапијску ефикасност дозе натријум бикарбоната од 3 mmol/kg. (80% преживелих животиња).

Супротно очекивањима, највећа испитивана доза (4 mmol/kg.) испољила је занемарљив заштитни ефект (20% преживелих животиња 24 сата после апликације наведених једињења).

Овај налаз је био пресудан да се у даљем току испитивања користи искључиво доза од 3 mmol/kg. јер је она показала поуздани потенцијал у смислу изазивања алкалозе али и добре заштитне ефекте у интоксигираних пацова. Изабрана доза је стога идентична оној коју су користили горе наведени аутори (Bajgar et al., 2001; Stefanović et al., 2004; Stefanović et al., 2006). Значај овог избора није битно умањен чињеницом да су у горе наведеним испитивањима коришћена друга ОФ једињења.

У нашој студији, примена средње леталне дозе (LD₅₀) малатиона доводи до дуготрајних метаболичких промена које су најизраженије 10 минута и 6 сати после интоксикације пацова. Двадесетчетири сата (24h) после тровања знаци ацидозе су још увек присутни али се вредности већине параметара (изузев концентрације базног пуферског система) статистички значајно не разликују од вредности контролне групе.

Од бројних праћених параметара, највећу осетљивост су показали рН вредност, концентрација базног пуферског система, концентрација слободних бикарбонатних јона и сатурација крви кисеоником (sO₂). Према наводима из класичних уџбеника интерне медицине (Rončević, 1990; Fauci et al., 2010) примарни поремећај код респираторних збивања је промена рСО₂ (порастан код ацидозе, снижење код алкалозе) а промена у концентрацији бикарбоната је секундарни, компензаторни догађај (одговор).

Примарни поремећај код метаболичких збивања је промена концентрације бикарбоната (снижење код ацидозе, пораст код алкалозе), промена у рСО₂ је секундарни, компензацијски догађај. У крви људи, физиолошке вредности базног ексцеса крећу се у распону од 2,5 mmol/L (мањка или вишка база).

На основу напред наведених чињеница, резултати наше студија указују да је применом малатиона дошло до развоја метаболичке ацидозе. На то указује пад концентрације слободних бикарбонатних јона у одсуству значајнијих промена рСО₂ (10 минута после примене малатиона).

Присутни знаци ацидозе 10 минута после пероралне апликације малатиона указују да је настанак ацидозе у иницијалној фази тровања (почетак ресорпције отрова из гастроинтестиналног тракта) могућ. Ово је у складу са подацима Ahdaya et al., (1981) да се у глодара (мишева) значајна ресорпција малатиона (40%), после пероралне примене, може очекивати после 10-15 минута.

Релативно доброј ресорпцији малатиона вероватно доприноси високи проценат органских растварача у техничкој формулацији која је испитивана. Ацидоза која је регистрована и 6 сати после тровања је очекивана обзиром на пуни обим метаболичких процеса малатиона у овом периоду. Двадесетчетири сата после тровања, у ткивним течностима су присутне релативно мале концентрације малатиона односно његовог активног метаболита малаоксона. Двадесет четири сата после тровања, захваљујући полувремену елиминације од око 8 сати, у ткивним течностима пацова се могу очекивати релативно мале концентрације малатиона (Gallo i Lawryk, 1991).

На основу добијених рН вредности, концентрације базног пуферског система и концентрације слободних бикарбонатних јона може се рећи да је регистрована ацидоза умереног степена. Овакав налаз је у складу са очекивањима будући да и резултати других експерименталних и клиничких студија, у којима је праћен ацидо-базни статус после интоксикације ОФ једињењима, указују да појава ацидозе али и други метаболички поремећаји (хипергликемија) у крви нису сталан односно универзалан налаз у свих експонираних јединки (Weizman i Sofer, 1992; Rahimi i Abdollahi, 2007; Liu et al., 2008; Sabzghabae et al., 2011).

Треба истаћи да, на основу експерименталних и клиничких студија, у којима је праћен ацидо-базни статус јединки (болесника) после интоксикације ОФ једињењима, појава ацидозе није сталан односно универзалан налаз.

Другим речима, уобичајеним статистичким анализама усредњавања валидних података могу се, у случају релативно малог броја узорака делимично изгубити (до непрепознатљивости) специфични маркери ацидозе. На основу рН вредности, концентрације базног пуферског система и концентрације слободних бикарбонатних јона може се рећи да је регистрована метаболичка ацидоза умереног степена.

Процена могућности антагонизовања метаболичке ацидозе изазване малатионом извршена је применом натријум бикарбоната NaHCO_3 у моменту максимално изражене алкалозе (10 минута после давања NaHCO_3).

Пад рН вредности настао применом малатиона у потпуности је антагонизован једнократном применом NaHCO_3 . Када је реч о вредностима pO_2 , изражени пад вредности овог параметра регистрован у групи пацова трованих малатионом, није могао бити коригован применом NaHCO_3 .

Вредности концентрације базног пуферског система у групи третираној малатионом и натријум бикарбонатом указују такође да натријум бикарбонат успешно антагонизује ацидозу изазвану малатионом. Регистровањем концентрације слободних бикарбонатних јона уочава се сличан тренд али се може закључити да је реч о некомплетном (парцијалном) антагонистичком ефекту натријум бикарбоната. Овај налаз је делимично у нескладу са резултатима Вајгара et al., (2001). Ови аутори, регистровану ацидозу нису могли антагонизовати применом NaHCO_3 . Разлоге за овај несклад видимо у следећем:

У раду Вајгара et al., (2001) ацидо-базни статус у пацова трованих нервним бојним отровом сарином, ОФ инсектицидом дихлорвосом и карбаматом пиридостигмином датих појединачно или у комбинацији са натријум бикарбонатом (и/или атропином и реактиватором холинестеразе обидоксимом) испитиван је непосредно пре интоксикације, у моменту појаве првих симптома интоксикације (фасцикулације мишића), у моменту развоја конвулзија и 24 сата после тровања (терапије). Целокупна терапија (укључујући и натријум бикарбонат) била је давана одложено, тек у моменту настанка конвулзивне активности.

Одложена примена NaHCO_3 (у моменту развоја конвулзивне активности) у себи садржи 2 неповољне компоненте:

1. експерименталне и клиничке студије (Spradling et al., 2011; Sungur i Güven, 2001) указују да се конвулзивна активност развија у релативно малом броју интоксицираних јединки (10-50%)
2. конвулзивна активност, самостално или у садејству са другим факторима може изазвати или продубити већ постојећи ацидо-базни дисбаланс.

У пацова трованих дихлорвосом и пиридостигмином у целом периоду од 24 сата после интоксикације регистована је умерена ацидоза. Примена натријум бикарбоната у моменту развоја конвулзивне активности није довела до корекције ацидозе. Упркос томе, у групама пацова интоксицираних дихлорвосом и третираних накнадно натријум бикарбонатом (без или са атропином) регистован је повећани број преживелих животиња 24 сата после интоксикације. Сумарно, проценат преживелих животиња се повећао чак и у одсуству корекције ацидозе.

Такође, активност инхибиране AchE, у крви и у одређеним регијама мозга пацова, није повећана применом натријум бикарбоната. Добијени резултати, нажалост, нису на адекватан начин коментарисани.

Утицај примене NaHCO_3 на исход тровања, у пацова трованих апсолутно смртном дозом малатиона, проучаван је 24 сата после примене отрова и различитих комбинација антидота. Ова процедура се рутински користи за процену антидотске моћи различитих једињења или лекова током акутне фазе различитих интоксикација, посебно када је реч о добро познатим отровима. Добијени подаци, посебно када се корелишу са другим праћеним параметрима, могу указати на могуће механизме дејства испитиваних једињења. У нашој студији, појединачна примена NaHCO_3 (3 ммол/кг) омогућила је преживљавање 80% пацова трованих апсолутно смртном дозом малатиона. Примена других стандардних антидота (без примене NaHCO_3) омогућава приближно исти ниво заштите (преживљавања). Упркос тога, у свим експерименталним групама у којима је, поред различитих комбинација стандардних антидота примењен NaHCO_3 , регистровано је повећање заштитне моћи за отприлике 20%. Максимални заштитни ефекат може се такође очекивати и у случају када се искључи примена диазепама.

Кoadминистрација NaHCO_3 је довела до побољшања заштитних ефеката стандардних антидота у пацова трованих дихлорвосом (Stefanović et al., 2004; Stefanović et al., 2006). У раду Jeevarathinam et al., (1988), профилактичка примена NaHCO_3 у пацова трованих DFP-ом довела је до даљег повећања заштитне моћи РАМ-2. Ови аутори су, у намери да објасне механизам дејства NaHCO_3 , утврдили да примена овог једињења омогућава бољу дистрибуцију РАМ-2 у различитим ткивима. На овај начин би се, посредним путем, повећала реактиваторска моћ РАМ-2 у неким виталним ткивима (мозак, дијафрагма).

На жалост, претпостављени концепт није могао бити генерализован. У раду Antonijević et al., (2002), у коме је као отров коришћен дихлорвос, реактиваторска моћ оксима није могла бити повећана упркос примене NaHCO_3 .

И у неким другим радовима (Balali-Mood et al., 2000; Bajgar et al., 2001; Balali-Mood et al., 2002) такође је показано да коадминистрација NaHCO_3 значајно потенцира терапијску ефикасност атропина у акутним тровањима ОФ једињењима.

Сви горе поменути резултати, упркос доказане успешности примене NaHCO_3 , указују да како експериментална тако и клиничка испитивања акутних тровања различитим ОФ једињењима нису успела открити јединствени, заједнички механизам ефекта NaHCO_3 . Слично другим ОФ једињењима малатион иреверзибилно инхибира ензим ацетилхолин естеразу (AChE) доводећи до акумулације ацетилхолина (ACh) на холинергичким синапсама.

Пораст ACh изазива холинергичку кризу због прекомерне стимулације мускаринских и никотинских рецептора у централном и периферном нервном систему укључујући и неуромишићну спојницу (McDonough and Shih, 1997; Bajgar, 2005; Aroniadou-Anderjaska et al., 2009). Почетни симптоми укључују миозу, стезање у грудима, отежано дисање уз погоршање других виталних функција. У каснијем току, ако се не предузму неопходне терапијске мере, долази до фасцикулације мишића, конвулзија и смртог исхода (McDonough and Shih, 1997; Bajgar, 2005; Myhrer, 2007; Aroniadou-Anderjaska et al., 2009). Савремена терапија подразумева примену анти-мускаринских лекова (нпр. атропин), који блокира дејства нагомиланог ACh на мускаринским рецепторима, оксима (нпр. 2-РАМ) који реактивира инхибиране молекуле AChE, и антиконвулзивних лекова као што је диазепам (McDonough and Shih, 1997; Filbert et al., 2005; Angoa-Pérez et al., 2010). Примена ових лекова (антидота) повећава преживљавање ако се примене у релативно кратком року после интоксикације ОФ једињења. У неким земљама света, као што је нпр. Иран, примена NaHCO_3 је, уз атропин и РАМ-2 постала стандардна терапија акутних тровања ОФ једињенима (Jalali et al., 2010).

У савременој студији из 2008. године (Liu et al., 2008), проучаван је утицај ацидо-базног статуса, непосредно пре хоспиталног лечења, на исход (преживљавање) болесника акутно трованих ОФ једињењима. Највећа смртност је регистрована у болесника са тзв. мешаном ацидозом. Присуство респираторне ацидозе значајно повећава смртност у односу на болеснике који су имали метаболичку ацидозу (50% : 25%).

Поједини аутори ипак указују на своју недоумицу око корисности примене NaHCO_3 у терапији ацидоза различите генезе (Stacpoole et al., 1994; Judge, 2005). Исходиште за свој став налазе и у резултатима других аутора. У раду Nakashima et al., (1996) тврди се да примена NaHCO_3 може довести до парадоксалне интраћелијске ацидозе због повећане продукције угљен диоксида (порекла NaHCO_3). Такође, у раду Singa and Branasa (1995) изнесена је тврдња да примена NaHCO_3 може угрозити снабдевање ткива кисеоником померањем дисоцијационе криве оксигемоглобина у лево.

Свакако не треба сметнути са ума чињеницу да у нашој студији примарни циљ није био корекција ацидозе сама по себи, већ стварање услова, да и у случају минималних корекција ацидозе, појачамо терапијски ефект стандардних антидота који се користе у тровању ОФ једињењима.

Од стране колега Центра за контролу тровања ВМА, а за потребе ове докторске студије, добијена је сагласност за коришћење дела резултата који су плод сарадње Клинике за ургентну и клиничку токсикологију и Одељења за токсиколошку хемију, Центра за контролу тровања ВМА.

Аналитички су обрађени узорци болесника трованих малатионом који су лечени на Клиници за ургентну и клиничку токсикологију у периоду 2010-2012. година. Концентрације малатиона и његовог активног метаболита малаоксона у крви и урину затрованих болесника одређиване су методом течне хроматографије са масеном спектрометријом (Zlatković et al., 2010).

Болесници су подељени на две групе и одмах по пријему на Клинику започета је следећа терапија:

1. група (Н = 3)

- Атропин сулфат је даван у дози од 1-2 mg и.в. сваких 5 минута до појаве хиператропинизације а након тога и.в. инфузијом 3 mg/h уколико је то објективни клинички налаз захтевао.
- РАМ-2 је даван и.в. у дози од 1 gr а након тога и.в. инфузијом 500 mg/h уколико су то клинички и биохемијски параметри захтевали.
- Натријум бикарбонат је 1. сата даван у дози од 4 mEq/kg а након тога је идентична доза континуирано примењивана и.в. инфузијом током 24 сата, у трајању од 2 дана.

2. група (Н = 3)

- Атропин сулфат је даван у дози од 1-2 mg и.в. сваких 5 минута до појаве хиператропинизације а након тога и.в. инфузијом 3 mg/h уколико је то објективни клинички налаз захтевао.
- РАМ-2 је даван и.в. инфузијом у дози од 1 gr а након тога и.в. инфузијом 500 mg/h уколико су то клинички и биохемијски параметри захтевали.

По свим битним параметрима, који су процењивани током пријема на Клинику (времену од ингестије отрова до пријема, степену тежине тровања-ПСС скор, степену инхибиције праве и псеудохолинестеразе) као и на основу других објективних биохемијских параметара, обе групе болесника биле су хомогене.

Према горе наведеним параметрима болесници су припадали категорији умерено до тешко затрованих. Узорци крви и урина прикупљани су континуирано, сваких 6 сати, током прва 4 дана лечења. Током иницијалне фазе лечења (првих 12 сати) у групи болесника који су поред стандардне терапије примали инфузију натријум бикарбоната регистроване су двоструко ниже концентрације малатиона у односу на групу болесника код којих није примењена инфузија натријум бикарбоната (Слика бр.). У каснијој фази лечења, вредности концентрација малатиона у обе групе се скоро у потпуности изједначавају.

Истовремено, у почетној фази терапије, концентрације активног метаболита малаоксона су 10 пута веће у групи болесника третираних натријум бикарбонатом у односу на болеснике код којих је примењена стандардна терапија (Слика бр.). Иако број болесника који је обухваћен овим испитивањима не омогућава доношење чврстих, општих закључака, уочава се да је, вероватно под дејством натријум бикарбоната, значајно убрзан метаболизам малатиона.

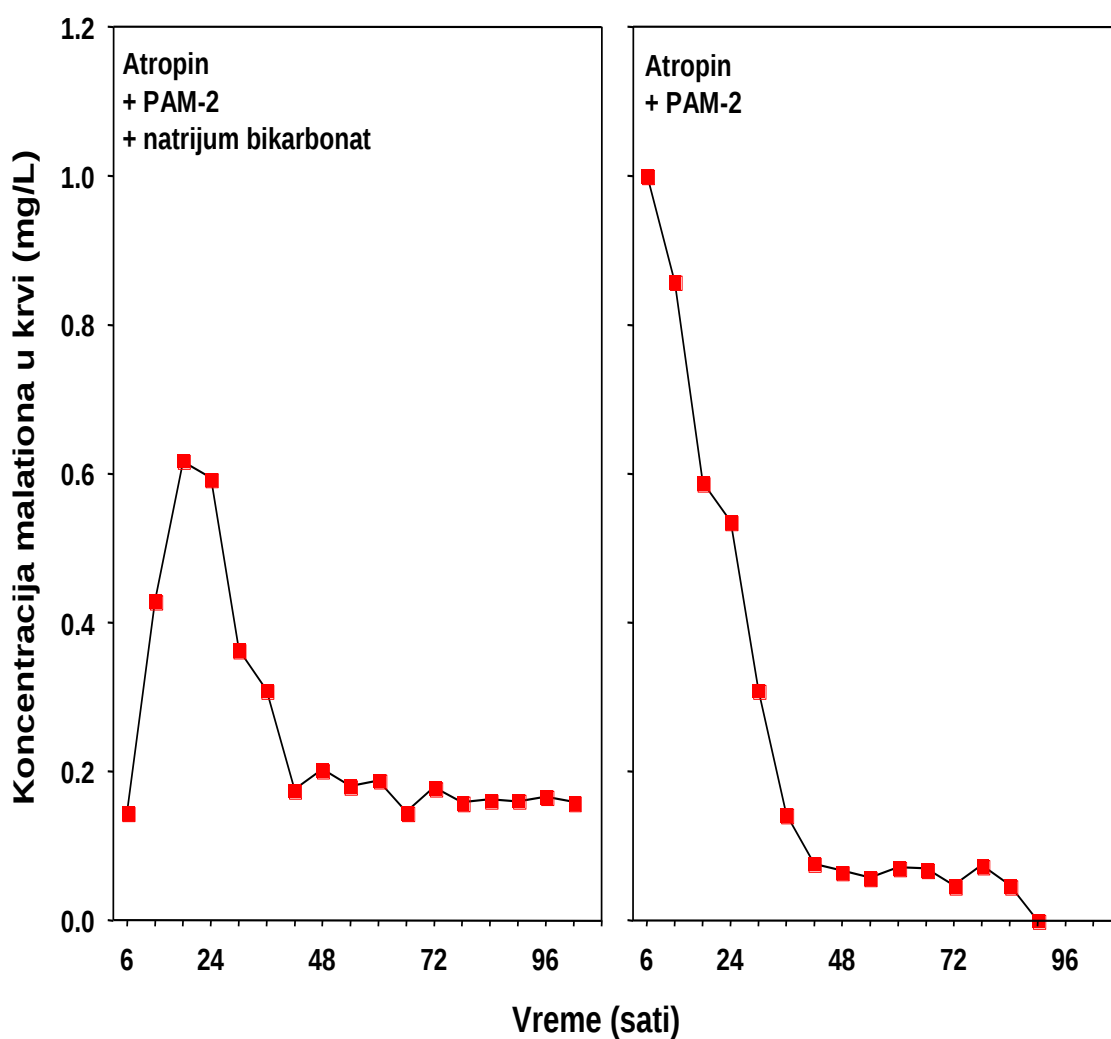
Прецизна интерпретација изнетих резултата веома је тешка обзиром на истовремено (паралелно) одвијање следећих процеса у организму:

- Процес детоксикације малатиона везивањем за карбоксилестеразе
- Спонтаног цепања комплекса карбоксилестераза-малатион (настају мање токсични или нетоксични метаболити)
- Процес конверзије малатиона у активни метаболит малаоксон.
- Инхибиција псеудо- и праве холинестеразе од стране малаоксона
- Реактивације инхибираних холинестераза од стране присутног реактиватора ChE РАМ-2.
- Промене ацидо-базног статуса као последица примене натријум бикарбоната

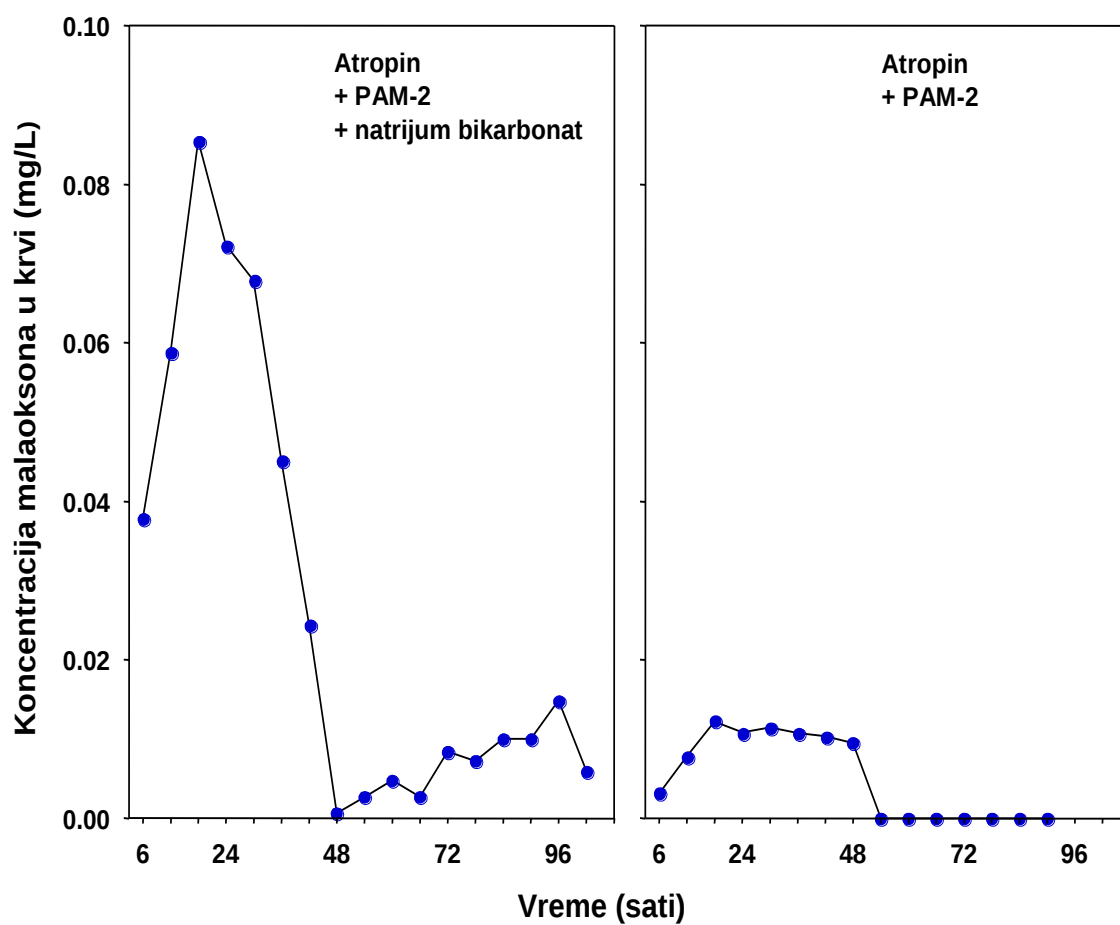
Брзина, односно динамичност свих ових процеса, појединачно али и збирно вероватно је од пресудног значаја за укупни терапијски ефект примењене терапије. Регистроване концентрације малатиона и малаоксона у узорцима урина болесника обе групе су приближно исте (није показано). То нас наводи на закључак да примена натријум бикарбоната не доводи до убрзане елиминације присутних отрова у организму.

Такође, континуираним праћењем активности ChE запажено је да се просечне вредности овог ензима статистички значајно не разликују између група.

Додатни резултати, који се на овом месту шире не елаборирају (смањен утрошак атропина по болеснику, смањена потреба за коришћењем механичке вентилације) у групи болесника код којих је примењен натријум бикарбонат, само су додатна потврда делотворности примене натријум бикарбоната у интоксикацијама малатионом (Vučinić et al., 2011).



Слика бр. 16. Компаративни преглед концентрације малатиона у крви пацијената лечених атропином и PAM-2 и атропином и PAM-2 и NaHCO_3



Слика бр. 17. Компаративни преглед концентрације малаоксона у крви пацијената лечених атропином и PAM-2 и атропином и PAM-2 и NaHCO₃

VII. ЗАКЉУЧАК

1. Коришћена технолошка формулација малатиона испољила је високу и репродуцибилну акутну токсичност у пацова током извођења испитивања. Добијена средња летална доза (LD_{50}) малатиона указује на присуство високо токсичног метаболита малаоксона у формулацији.
2. На основу испитивања гасних параметара артеријске крви пацова као и праћењем заштитних ефеката различитих доза $NaHCO_3$ у пацова трованих апсолутно смртном дозом малатиона ($1,3 LD_{50}$), показано је да је оптимална доза $NaHCO_3$ 3 mmol/kg ip .
3. Применом средњих леталних доза малатиона изазивају се конзистентне и дуготрајне метаболичке промене које су најизраженије 10 минута и 6 сати после интоксикације пацова малатионом. Праћени параметри указују да је у питању метаболичка ацидоза.
4. Од бројних праћених параметара, највећу селективност (осетљивост) су показали рН вредност, концентрација базног пуферског система ($sBase$), концентрација слободних бикарбонатних јона ($sHCO_3^-$) и сатурација кисеоника (sO_2).
5. У иницијалној фази интоксикације малатионом, изабрана доза $NaHCO_3$ успешно антагонизује метаболичке промене изазване овим отровом.
6. Највећи заштитни ефект, регистрован 24 сата после примене $1,3 LD_{50}$ малатиона, испољава група третирана атропином, РАМ-2 хлоридом, диазепамом и $NaHCO_3$.
7. Постигнути заштитни ефекти антидота датих *per se* или у комбинацији са $NaHCO_3$, нису у директној корелацији са ацидо-базним статусом.
8. Појединачна примена $NaHCO_3$, у иницијалној фази тровања малатионом, без обзира на краткотрајност свог ефекта у смислу постизања алкалозе, омогућава веће преживљавање експерименталних животиња трованих смртним дозама малатиона.

9. Обзиром на чињеницу да је доминантни носилац токсичности малатиона његов активни метаболит малаоксон, за претпоставити је да изазвана алкалоза доводи до убрзане разградње малатиона и малаоксона до њихових нетоксичних компоненти.

VIII. LITERATURA

1. Aldridge WN, Miles JW, Mount DL, Vershoyle RD. The Toxicological Properties of Impurities in Malathion. *Arch Toxicology* 1979; 42: 95-106.
2. Aldridge WN. Toxicology of Trialkylphosphotioates with particular reference to lung toxicity. *Toxicological Science* 1984; 4: 215-223.
3. Angoa-Pérez M, Kreipke CW, Thomas DM, Van Shura KE, Lyman M, McDonough JH, Kuhn DM. Soman increases neuronal COX-2 levels: possible link between seizures and protracted neuronal damage. *Neurotoxicology* 2010; 31: 738–746.
4. Antonijević B, Stojilković MP, Bokonjić D, Vučinić S. Antidotal effect of combinations obidoxime/HI-6 and memantine in mice poisoned with soman, dichlorvos or heptenophos. *Vojnosanit pregl* 2011; 68 : 1033-1040.
5. Antonijevic B, Stefanovic D, Milovanovic ZA, Stojiljkovic MP, Bokonjic D. Standard antidotes along with sodium bicarbonate in organophosphate poisoning. *Proceedings of CB Medical Treatment Symposium IV*, April 28–May 3; Spiez, Switzerland 2002, pp. 12–16.
6. Antonijevic B, Bokonjic D, Stojiljkovic MP, Kilibarda V, Milovanovic ZA, Nedeljkovic M, Maksimovic M. Efficacy of trimedoxime in mice poisoned with dichlorvos, heptenophos or monocrotophos. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96 : 111–117.
7. Arena G, Rizzarelli E, Sammartano S. A nonlinear leastsquares approach for the refinement of the parameters involved in potentiometric acidbase titrations. *Talanta* 1979; 26 (1): 1-14.
8. Aroniadou-Anderjaska V, Figueiredo TH, Apland JP, Qashu F, Braga MFM. Primary brain targets of nerve agents: the role of the amygdala in comparison to the hippocampus. *Neurotoxicology* 2009; 30: 772–776.
9. Ahdaya SM, Monroe RJ, Guthrie FE. Absorption and dostribution of intubated insecticides in fasted mice. *Pest Biochem Physiol* 1981;16 (1):38-46.
10. Bairy KL, Vidyasagar S, Sharma A, Sammad V. Cotroversies in the managment of organophosphate pesticide poisoning. *Ind J Pharmacol* 2007; 39(2): 71-74.
11. Bajgar J, Portmann R. The treatment of intoxication with selected organophosphates and a carbamate: comparison of different therapeutic approaches. *Proceedings of CBMTS-Industry II, World Congress on Chemical and Biological Terrorism*. Dubrovnik, Croatia, April 22–27, 2001, pp. 180–84.
12. Bajgar J. Complex view on poisoning with nerve agents and organophosphates. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2005; 48 (1): 3–21.

13. Ballantyne B, Marrs TC. Pharmacology and toxicology of organophosphates. USA 1992.
14. Baker EJr, Warren M, Yack M, Dobbin RD, Miles JW, Miller S, Alderman L, Teeters WR. Epidemic malathion poisoning in Pakistan malaria workers. *Lancet* 1978; 7: 31-34.
15. Balali-Mood M, Shahab-Ahmadi A, Salimifar M, Shariate M. Effects of sodium bicarbonate in human organophosphate poisoning. *Proceedings of Chemical and Biological Medical Treatment Symposium III*, Spiez, Switzerland, May 7–12, 2000, pp. 1–4.
16. Balali-Mood M, Ayati MH, Ali-Akbarian H. Effects of high doses of sodium bicarbonate in acute organophosphate pesticide poisoning. *Proceedings of Chemical and Biological Medical Treatment Symposium IV*, Spiez, Switzerland, April 28–May 28–3, 2002, pp. 21–25.
17. Balali-Mood M, Ayati M, Ali Akbarian H. Effects of high doses of sodium bicarbonate in acute organophosphorus pesticide poisoning. *Clin Toxicol* 2005; 43: 571-574.
18. Balali Mood M, Shariate M. Treatment of organophosphate poisoning. *J Physiol* 1998 ; 92(5-6): 375-8.
19. Bardin PG, Van Eeden SF. Organophosphate poisoning: grading the severity and comparing treatment between atropine and glycopyrrolate. *Crit Care Med* 1990; 18: 956-960.
20. Bartosova L, Kuca K, Kunesova G, Jun D. The acute toxicity of acetylcholinesterase reactivators in mice in relation to their structure. *Neurotox Res* 2006; 9 :291–96.
21. Bhagwat VM, Ramachandran BV. Enzymic hydrolysis of malaoxon by mouse liver homogenates. *Biochem Pharmacol.*1975;24(21):2002-3.
22. Berteau PE, Deen WA. A comparison of oral and inhalation toxicities of four insecticides to mice and rats. *Bull Environ Contamin Toxocol* 2002; 19 (1): 113-120.
23. Beck JR. Controversies about therapy are often rooted in the assessment of prognosis. One sometimes undertakes a risky therapeutic procedure hoping that it will reduce or eliminate the mortality or morbidity of an underlying condition. Faced with a choice of therapies for a particular *Medical Decision Making* 1983.
24. Beekley MD, Cullom DL, Brechue WF. Hypercapnic impairment of neuromuscular function is related to afferent depression. *Eur J Appl Physiol* 2004; 91: 105-110.
25. Bismuth C, Inns RH, Marrs TC. Efficacy, toxicity and clinical use of oximes in anticholinesterase poisoning. In: *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates*. Eds. B. Ballantyne, TC Marrs. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1992, pp. 555–577.
26. Bleeker JL. The remaining negatively charged monophosphylate ester of serine is resistant to spontaneous or oxime-mediated reactivation. *Handbook of Clinical Neurology*, 2008.
27. Blodgett DJ. Organophosphate and carbamate insecticides. *Small Animal Toxicology*. Saint Louis, 2006; 941-953.

28. Bokonjić D, Jovanović D, Jokanović M. Protective effects of oximes HI-6 and PAM 2 applied by osmotic minipumps in quinalphos poisoned rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1987; 288: 309-318.
29. Bokonjić D, Rosić N. Anticonvulsive and protective effects of diazepam and midazolam in rats poisoned by highly toxic organophosphorus compounds. *Arh Hig Rad Toksikol* 1991; 42(4): 359-6.
30. Bokonjić D. Tear gases as incapacitating agents. *Vojnosanit Pregl* 2001; 58(6): 685-8.
31. Bosković B, Vojvodić V, Pilipović I. Pralidoxime as an antidote in organophosphorus compound poisoning. *Nar Zdrav* 1973 ; 29(4): 115-8.
32. Bošković B. Pretreatment of animals with a metabolite of triortocresyl phosphate in mice. *Fund Appl Toxicol* 1979; 23: 112-116.
33. Bošković B. The influence of 2-/o-cresyl/-4 H-1:3:2-benzodioxaphosphorin-2-oxide (CBDP) on organophosphate poisoning and its therapy. *Arch Toxicol* 1979; 42(3): 207-16.
34. Bošković B, Kovačević V, Jovanovic D. PAM-2 Cl, HI-6, and HGG-12 in soman and tabun poisoning. *Fundam Appl Toxicol* 1984; 4 (2 Pt 2): S106-15.
35. Bošković B. The Treatment of Soman Poisoning and its Perspectives. *Fund Appl Toxicol* 1981; 203-213.
36. Boner MR, Coble J, Blair A, Freeman LEB, Hoppin JA, Sandler DA, Alavanja MCR. Malathion Exposure and the Incidence of Cancer in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol* 2007; 166 (9) : 1023-1034.
37. Braestrup C, Squires RF, Bock E, Pedersen CT. Benzodiazepine receptors: cellular and subcellular localization in brain. *Adv Pharmacol* 1978; 12: 345-348.
38. Braestrup C. Pharmacological characterization of benzodiazepine receptors in the brain. *Eur J Pharmacol* 1978; 48 : 263-270.
39. Busker RW, Ziljistra JJ, Van der Wiel BPC, Meichers HPM. Organophosphate poisoning: a method to test therapeutic effects of oximes other than acetylcholinesterase activation in the rat. *Toxicol* 1991; 69: 331-334.
40. Cao C, Jung YD. Angiogenesis et Metastasis and inhibition of matrix metalloproteinases. *Internat J Experiment* 2001; 26: 98-104.
41. Capacio BR, Shih TM. Anticonvulsant actions of anticholinergic drugs in soman poisoning. *Epilepsia* 1991; 32(5): 604-15.
42. Ćetković S, Bosković B. Phrenic nerve-diaphragm preparation in situ for studying the detoxification of soman in the rat liver. *J Pharmacol Meth* 1988; 19(1) : 31-7.

43. Chang FCT, Foster RE, Beers ET, Rickett DL, Filbert MG. Neurophysiological concomitants of soman-induced respiratory depression in awake, behaving guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990; 102: 233–250.
44. Chilcott RP, Dalton CH, Hill I, Davidson CM, Blohm KL, Hamilton MG. Clinical manifestations of VX poisoning following percutaneous exposure in the domestic white pig. *Hum Exp Toxicol* 2000; 22: 255–261.
45. Shih TM, Mc Donough JH. The dose response effects of repeated subacute sarin exposure on guinea pigs. *Pharmacol Biochem* 2002; 72: 836-845.
46. Chatonnet F, Boudinot E, Chatonnet A, Taysse L, Daulon S, Champagnat J, Foutz AS. Respiratory survival mechanisms in acetylcholinesterase knockout mouse. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 1419–1427.
47. Cordoba D, Cadavid S, Angulo D, Ramos I. Organophosphate poisoning: modifications in acid base equilibrium and use of sodium bicarbonate as aid in the treatment of toxicity in dogs. *Vet Hum Toxicol* 1983; 25 : 1-3.
48. Costa LG, Klassen CD. Toxic effects of pesticides. *Casaret and Doulls Toxicology: The Basic Science of Poisons*. McGraw Hill Medical, New York, 2008; 883-930.
49. Daly I. A 24 h-month oral toxicity/oncogenicity study of malathion in the rat via dietary administration. Lab. project No. 90-3641. Unpublished study prepared by Huntington Life Sciences. EPA MRID 4392901. Toxicological Profile for Malathion. US Department of Health Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease registry. Public Health service, Atlanta, 2003.
50. Dauterman WC. Biological and nonbiological modification of organophosphorus compounds. *Bul WHO*; 44 : 133-150.
51. Dickson EW, Bird SB, Gaspari RJ, Boyer EW, Ferris CF. Diazepam inhibits organophosphate induced central respiratory depression. *Acad Emerg Med* 2003; 10: 1303-1306.
52. Durham M, Hayes K. Although the therapeutic principles of poisoning with organophosphate pesticides are largely accepted several points still remain open to discussion. *Arch Toxicol* 1971; 2: 156-160.
53. Gallo MJ, Lawryk NJ. Organic phosphorus pesticides. *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego, 1991; 2: 17-1123.
54. Garcia-Repetto R, Martinez D, Repetto M. The influence of pH on the degradation kinetics of some organophosphorus pesticides in aqueous solution. *Vet Hum Toxicol* 1994; 36: 202-204.

55. Gupta RC. The role of esterases other than acetylcholinesterase (ACHE) in the binding of organophosphates has been well described. *Arch Toxicol* 1987; 34: 121-126.
56. Guven K, Power RS, Avramides S, Allender R, Pomerai DI. The toxicity of dithiocarbamate fungicides to soil nematodes, assessed using a stress-inducible transgenic strain of *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem* 1999; 5: 12-18.
57. Haddad LM, Carinton FB, Simpson VM. The organophosphates and other insecticides. In: Haddad LD, Shannon MW, Winchester JF, eds. *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998: 836-840.
58. Hay G. Sarin poisoning in Matsumoto: Nagano prefecture. *J Toxicol Sci* 1994; 9(3): 85-8.
59. Hazardous Substances Databank (HSDB). Malathion. US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Library of Medicine, 2008.
60. Hodek P, Janšćák P. The main reason for studying the metabolism and binding of these compounds is their therapeutic use, since derivatives of adamantane are used in the treatment of Parkinsonism. *Eur J Pharmacol* 1985; 7: 14-20.
61. Holmstadt B. Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Rev* 1959; 11: 567-688.
62. Holmstadt B, Lundgren G, Sindwal A. Determination of acetylcholinesterase activity in normal and denervated sympathetic ganglia of the cat. A biochemical and histochemical comparison. *Acta Physiol Scand* 1963; 57: 235-47.
63. Holmstadt B, Lundgren G, Sindwal A. Tremorine and atropine effects on brain acetylcholine. *Life Sci* 1963; 10: 731-6.
64. Hornsby AG, Wauchope RD, Herner AE. *Pesticide Properties in the Environment*. Springer-Verlag, New York, 1996.
65. Guven M, Sungur M, Eser B, Sari I, Altuntas S. The effects of fresh frozen plasma on cholinesterase levels and outcomes in patients with organophosphate poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004; 42: 617-623.
66. Gupta RC. Acute malathion toxicosis and related enzymatic alterations in *Bubalus bubalis*: antidotal treatment with atropine, PAM-2 and diazepam. *J Toxicol Environ Health* 1984; 14(2-3): 291-303.
67. Eddleston M, Eyer P, Worek F, Mohamed F, Senarathna L, Von Meyer L. Differences between organophosphorus insecticides in human self poisoning: a prospective cohort study. *Lancet* 2005; 366: 1452-1459.
68. Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* 2008; 371: 597-607.

69. Edwards JW, Lee SG, Heath L, Pisaniello D. Worker exposure and risk assessment of malathion and fenthion used in the control of Mediterranean fruit fly in South Australia. *Environment Res* 2007; 103: 38-46.
70. EC. Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for the Experimental and Other Scientific Purposes, (ETS 123), 1998.
71. EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (86/609/EEC), 1986.
72. Elsevier Y, Hoshikawa HJ Kwon, Yoshida M, Horinouchi S. and Beppu T. *Exp Cell Res* 1994; 214: 189–197. 885–892.
73. Fabritius K, Balasescu M. Acute non-occupational intoxications with pesticides in Romania: a comparative study from 1988 to 1993. *Toxicol Lett* 1996; 88: 211-214.
74. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, i sar. Harisonov priručnik medicine. Datastatus, Beograd.
75. Filbert M, Levine E, Ballough G. Neuroprotection for nerve agent-induced brain damage by blocking delayed calcium overload: a review. *J Med Chem Biol Radiol Def* 2005; 3: 1–21.
76. Frawley JP, Fuyat HN, Hagan EC, Blake JR, Fitzhugh OG. Marked potentiation of mammalian toxicity from simultaneous administration of two anticholinesterase compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 1957; 121:96-106.
77. Inns RH, Leadbeater L. The efficacy of byspiridinium in the treatment of organophosphate poisoning in the guinea-pig. *J Pharm Pharmacol* 1983; 35(7): 427-33.
78. Insecticide Toxicology. Gulf War and Health. Volume 2. Insecticides and Solvents. National Academy of Sciences, Institute of Medicine. The National Academies Press. Washington 2003; 43-46: 69-81.
79. Izmerov NF. Malathion. Scientific Reviews of Soviet literature and Toxicity and Hazards of Chemicals, No VIII: 1-18, 1982.
80. Jacobsson SO, Sellström A, Persson SA, Cassel GE. Correlation between cortical EEG and striatal microdialysis in soman-intoxicated rats. *Neurosci Lett* 1997; 231(3): 155-8.
81. Jalali N, Balali-Mood M, Jalali I, Shakeri T. Electrophysiological changes in patients with acute organophosphorous pesticide poisoning. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;108:251-255.
82. Jeevarathinam K, Ghosh AK, Srinivasan A, Das Gupta S. Pharmacokinetics of pralidoxime chloride and its correlation to therapeutic efficacy against diisopropyl fluorophosphate intoxication in rats. *Pharmazie* 1988; 43: 114–15.

83. Jiung Hsiun L, Che Yi C, Yao Lung L, Pen Yuan L, Po Wen L, Hsin Hung L, Ya Fei Z. Acid-base interpretation can be the predictor of outcome among patients with acute organophosphate poisoning before hospitalization. *Amer Jour of Emerg Med* 2008; 26 : 24-30.
84. Jokanović M, Maksimović M. A comparison of trimedoxime, obidoxime, pralidoxime and HI-6 in the treatment of oral organophosphorus insecticide poisoning in the rat. *Arch Toxicol* 1995; 70: 119–23.
85. Jokanović M, Kosanović M, Maksimović M. Interaction of organophosphorus compounds with carboxylesterases in the rat. *Arch Toxicol* 1996; 70: 444-450.
86. Jokanović M. Toksikologija. Princip Press-Portal, Beograd, 2010.
87. Jokanović M, Kosanović M. Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010; 29(3): 195-201.
88. Jovanović D, Joksović D, Vucinić S, Todorović V, Segrt Z, Kilibarda V, Bokonjić D. Serbia National Poison Control Centre: organization and current activities. *Przegl Lek* 2005; 62(6): 547-51.
89. Judge BS. Metabolic acidosis: differentiating the causes in the poisoned patient. *Med Clin N Am* 2005; 89: 1107-24.
90. Karalliedde L, Henry J. The acute cholinergic syndrom. In: *Organophosphates and health*. Eds. Karalliedde L, Feldman S, Henry J, Marrs T. Imperial College Press, London, 2001, pp. 257–94.
91. Karalliedde L, Senanayake N. Organophosphorus insecticide poisoning. *Br J Anaesthet* 1989; 63(6): 736-50.
92. Karczmar AG, Ishi S, Blaber LC. Investigations, particularly by means of the acetylcholinesterase agents, of the multiple peripheral and central cholinergic mechanisms and of their behavioral implications. *Acta Vitamol Enzimol* 1970; 24(4): 131-89.
93. Kamrin MA. *Pesticide Profiles. Toxicity, Environmental Impact and Fate*. Lewis Publishers, New York, 1997; 191-195.
94. Kan N. Lethality of suicidal organophosphorus poisoning in an Indian population: exploring preventability. *Ann Gen Psychiatr* 2006; 5: 17.
95. Kidd H, James DR, Eds. *The Agrochemicals Handbook, Third Edition*. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991: 5-14.
96. Koelle GB, Volie RL, Holmstadt B, Karczmar AG, Obrien RD. Anticholinesterase agents. *Science* 1963; 41(3575): 63-5.

97. Kovačević V, Maksimović M, Jakanović M, Bošković B. The efficacy of oximes and anticholinergics in organophosphorus insecticide poisoning in the rat. 10th International Congress of Pharmacology, Sydney, Australia, 1987; 23-28.
98. Kušić R, Bošković B, Vojvodić V, Jovanović D. HI-6 in man: blood levels, urinary excretion, and tolerance after intramuscular administration of the oxime to healthy volunteers. *Fund Appl Toxicol* 1985; 5: 889-897.
99. Kusić R, Bosković B. Present trends in the therapy of poisoning by nerve poisons for warfare. *Vojnosanit Pregl* 1984; 41(5): 364-8.
100. Kušić R. HI-6 in man: Efficacy of the oxime in poisoning by organophosphorus insecticides. *Hum Exp Toxicol* 1991; 10: 113-118.
101. Lashof GC. Illness Among Gulf War Veterans: Risk Factors, Realities, and Future Research *Jama* 1998;280(11):1010-1011.
102. Lallement G, Baubichon D, Clarençon D, Galonnier M, Peoch M, Carpentier P. Review of the value of gacyclidine (GK-11) as adjuvant medication to conventional treatments of organophosphate poisoning: primate experiments mimicking various scenarios of military or terrorist attack by soman. *Neurotoxicol* 1999; 20(4): 675-84.
103. Lee P, Tai DY. Clinical features of patients with acute organophosphate poisoning requiring intensive care. *Intensive Care Med* 2001; 27: 694-699.
104. Litchfield JT, Wilcoxon L. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol Exp Therap* 1949; 96: 99–113.
105. Liu WF. A symptomatological assessment of organophosphate-induced lethality in mice: comparison of atropine and clonidine protection. *Toxicol Lett* 1991; 56(1-2): 19-32.
106. Liu JH, Chou CY, Liu YL, Liao PY, Lin PW, Lin HH, Yang YF. Acid base interpretation can be the predictor of outcome among patients with acute organophosphate poisoning before hospitalization. *Am J Emer Med* 2008;26:24-30.
107. Lekeux P, Kyavu A, Clercx C, Ansay M. Pulmonary function changes induced by experimental dichlorvos toxicosis in calves. *Res Vet Sci* 1986; 40: 318–323.
108. Leveridge YR. Pesticide poisoning in Costa Rica during 1996. *Vet Hum Toxicol* 1998; 40(1): 42-4.
109. Lipp JA. Effect of diazepam upon soman-induced seizure activity and convulsions. *Electroenceph Clin Neurophys* 1972; 32: 557-560.
110. Malathion. Revised human health risk assessment for the reregistration eligibility decision document (RED). EPA-HQ-OPP-2004-0348-0057. US Government Printing Office; Washington.

111. Maynard RL, Beswic FW. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents. In: Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates. Eds. Ballantyne B, Marrs TC, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1992, pp. 373–385.
112. Massoulie J, Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann Rev Neurosci* 1982; 5: 57-106.
113. Matsuda Y, Nagao M, Takatori T, Nijiima H, Nakajima M, Iwase H, Koybashi M, Iwadata K. Detection of the sarin hidrolisis product in formalin-fixed brain tissues of victims of the Tokyo subway terrorist attack. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 150: 310-320.
114. McDonough JH Jr, Shih TM. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 559–579.
115. Mc Donough JH, Mc Leold C, Nipwoda TM. Direct microinjection of soman or VX into the amygdala produces repetitive limbic convulsions and neuropathology. *Brain Res* 1987; 436: 123-137.
116. Menzer RE. Selection of Animal Models for Data Interpretation. In *Toxic Substances and Human Risk: Principles of Data Interpretation*. Robert GT, Rodricks JV, Eds. Plenum Press, New York, 1987: 5-80.
117. Mitić M, Kecman I. *Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Srbiji 2010*. Izd; Društvo za zaštitu bilja Srbije, Privredni pregled, Beograd, 2010.
118. Morita H, Yanagisawa N, Nakajima T, Suimizu M, Hiraba Y, Ashi H, Okudera H, Nohmra M, Midorikawa Y, Mimurea S. Sarin poisoning in Matsumoto Japan. *Lancet* 1995; 346 (8970): 290-3.
119. Mulla MS, Mian LS, Kawecki JA. Distribution, transport, and fate of the insecticides malathion and parathion in the environment. *Resid Rew*, New York, 1981.
120. Myhrer T. Neuronal structures involved in the induction and propagation of seizures caused by nerve agents: implications for medical treatment. *Toxicology* 2007; 239 (1-2): 1–14.
121. Murphy SD, Anderson rl, DuBois KP. Potentiation of toxicity of malathion by triorthotolyl phosphate. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959; 100: 382-487.
122. Nakashima K, Yamashita T, Kashiwagi S, et al. The effect of sodium bicarbonate on CBF and intracellular pH in man: stable Xe-CT and ³¹P-MRS. *Acta Neurol Scand Suppl* 1996; 166: 96-8.
123. Namba N. Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects. *Bull World Health Organ* 1971; 44 (1-3): 289-307.

124. Nozaki H, Hori S, Shinozawa S, Fujishima K, Takuma K, Sagoh H, Kimura T, Ohki M, Suzuki M, Aikawa N. Secondary exposure of medical staff to sarin vapor in the emergency room. *Inten Care Med* 1995; 12: 1032-1035.
125. Nozaki H, Aikawa N, Fujishima S, Suzuki M. A case of VX poisoning and the difference from sarin in Tokyo subway. *Lancet* 1995; 21: 123-129.
126. Palacio DC. New approach to treatment of OP poisoning. *Ant Med Medellin* 1982; 31: 1-2.
127. Pawar KS, Bhoite RR, Pillay CP, Chavan SC, Malshikare DS, Garad SG. Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369: 1425-1426.
128. Pellegrini G, Santi R. Potentiation of toxicity of organophosphorus compounds containing ester functions toward warm blooded animals by some organophosphorus impurities. *J Agric Food Chem* 1972; 20: 944-950.
129. Peter JV, Cherian AM. Organic insecticides. *Anaesth Intens Care* 2000; 28: 11-21.
130. Peter JV, Moran JL, Graham P. Oxime therapy and outcomes in human organophosphate poisoning: an evaluation using meta analitic techniques. *Crit Care Med* 2006; 34: 502-510.
131. Peter JV, Moran JL, Sudarsanam TD, Graham P. High dose pralidoxime for organophosphorus poisoning. *Lancet* 2007; 369: 157-162.
132. Peter JV, Moran JL, Graham PL. Advances in the management of organophosphate poisoning. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8: 1451-1464.
133. Petroianu G, Beha U, Roth C, Bergler W, Rufer R. L-lactate protects in vitro acetylcholinesterase from inhibition by paraoxon (E600). *J Appl Toxicol* 2000; 20: 249-257.
134. Petroianu G, Kartcher B, Kern N, Hardt F, Helfrich U, Rufer R. L-lactate reduces in vitro the inhibition of butyrylcholinesterase by paraoxon (E600). *J Appl Toxicol* 1999; 19: 329-336.
135. Preve da Silva A, Meotti FC, Santos ARS. Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. *Neurotoxicol* 2006 ; 27 (6): 1101-1105.
136. Raushel FM. A series of achiral, chiral, and racemic mixtures of paraoxon analogues containing various combinations of methyl, ethyl, isopropyl, or phenyl substituents were synthesized as probes of the stereochemical constraints within the active site of phosphotriesterase. The kinetic constants for these. *Biochem* 1999; 2: 134-140.
137. Rahimi R, Abdollahi M. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2007; 88: 115–21.
138. Rahimi R, Nikfar S, Abdollahi M. Increased morbidity and mortality in acute human organophosphate poisoned patients treated by oximes: meta analysis of clinical trials. *Hum Exp Toxicol* 2006; 25: 157-162.

139. Registration Eligibility Decision (RED) for Malathion EPA 738-R-06-030; US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, US Government Printing Office, Washington, 2006.
140. Revised Registration Eligibility Decision (RED) for Malathion. EPA 738-R-06-030; US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, US Government Printing Office; Washington, 2009.
141. Reigart JR, Roberts JR. Organophosphate insecticides. Recognition and Management of Pesticide Poisonings. US Environmental Protection Agency. Office of Prevention. Pesticides and Toxic Substances. Office of Pesticide Programs. US Government Printing Office. Washington, 1999; 34-37.
142. Reddy VK, Deshpande SS, Cintra WM. Enzyme reactivation by HI-6 following soman poisoning has been documented. *Appl Toxicol* 1991; 4: 13-16.
143. Reiner E, Pleština R. Regeneration of cholinesterase activities in humans and rats after inhibition by 0,0 –dimethyl- 2,2-dichlorovinyl phosphate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979; 49: 451-454.
144. Rivett K, Potqietier PD. Diaphragmatic paralysis after organophosphate poisoning: a case report. *S Afr Med* 1987; 72(12): 881-2.
145. Robenshtok E, Luria S, Tashma Z, Hourvitz A. Adverse reaction to atropine and the treatment of organophosphate intoxication. *Isr Med Assoc J* 2002; 4: 535-539.
146. Roberts TR. Metabolic Pathways of Agrochemicals - part 2, Insecticides and Fungicides; The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998; 60-367.
147. Roberts D, Buckley NA. Alkalinisation for organophosphorus pesticide poisoning. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 25: CD004897.
148. Rončević T. Metabolizam vodika. U: Priručnik interne medicine (Ured. Hađić N, Radonić M, Vrhovac B, Vucelić B). Jugoslovenska medicinska naklada, Zagreb, 1990.
149. Rosić N, Bosković B, Kovacević V. Modern problems in toxicology research. *Srp Arh Celok Lek* 1986; 114(3): 345-58.
150. Russell AJ, Erbeltinger M, DeFrank JJ, Kaar J, Drevon G. Catalytic buffers enable positive response inhibition based sensing of nerve agents. *Biotechnol Bioeng* 2002; 77: 352-357.
151. Saadeh AM, Alali MK, Farsakh NA, Ghani MA. Clinical and sociodemographic features of acute carbamate and organophosphate poisoning: a study of 70 adult patients in north Jordan. *J Toxicol Clin Toxicol* 1996; 34(1): 45-51.

152. Sabzghabaee AM, Eizadi-Mood N, Gheshlaghi F, Adib N, Safaeian L. Is there a relationship between admission blood glucose level following acute poisoning and clinical outcome? *Arch Med Sci* 2011; 7 (1): 81–6.
153. Sabo A, Stilinovic N, Vukmirovic S, Bukumiric Z, Capo I, Jakovljevic V. Pharmacodynamic action of a commercial preparation of the mushroom *Coprinus comatus* in rats. *Phytother Res* 2010; 24 (10): 1532-7.
154. Saleh M, Ahmed A, Kamel A, Dary C. Determination of the distribution of malathion in rats following various routes in administration by whole body electronic autoradiography. *Toxicol Ind Health* 1997; 13 (6): 751-758.
155. Savić M, Obradović D, Ugresić N, Bokonjić D. The influence of diazepam on atropine reversal of behavioural impairment in dichlorvos-treated rats. *Pharmacol Toxicol* 2003; 93(5): 211-8.
156. Schonwald S. *Medical Toxicology-A Synopsis and Study Guides*. New York: Williams and Wilkins, 2001: 768-774.
157. Sellstrom H. *Antocolvusants in anticholinesterase poisoning*. USA 1992.
158. Sidel FR. Progress in medical defense againts nerve agents. *Am Med Assoc JAMA* 1989; 262: 649-652.
159. Siwach SB, Gupta A. The profile of acute poisonings in Harayana-Rohtak Study. *J Assoc Physic India* 1995; 43(11): 756-9.
160. Sivilotti ML, Bird SB, Lo JC, Dickson EW. Multiple centrally acting antidotes protect against severe organophosphate toxicity. *Acad Emerg Med* 2006; 13: 359-364.
161. Sing RF, Branas CA. Bicarbonate therapy in the treatment of lactic acidosis: medicine or toxin? *J Am Osteopath Assoc* 1995; 95: 52-7.
162. Singh BK, Walker A. Microbial degradatin of organophosphorus compounds. *Microbiol Rev* 2006; 30: 428-471.
163. Sokolović D, Bjelaković G, Zajić S, Damnjanović Z, Nikolić J, Kocić G, Pavlović D, Stojanović I, Cvetković T. Efekti L metionina na metabolizam poliamina u moždanom tkivu pacova sa holestazom. *Acta Medica Medianae* 2006; 45: 21-26.
164. Spradling KD, Lumley LA, Robison CL, Meyerhoff JL, Dillman JF. Transcriptional analysis of rat piriform cortex following exposure to the organophosphonate anticholinesterase sarin and induction of seizures. *Neuroinflammation* 2011; 8: 83-104.
165. Stanojević Z, Mitić R, Bukumirić Z, Bursać M, Bašćarević S, Rašić J. The effect of aspirin and ticlopidine on liver function test in rats. *Prax Med* 2004; 32: 7-10.

166. Stacpoole PW, Wright EC, Baumgartner TG, et al. Natural history and course of acquired lactic acidosis in adults. DCA-Lactic Acidosis Study Group. *Am J Med* 1994; 97: 47-54.
167. Stefanović D, Antonijević B, Bokonjić D, Stojiljković MP, Milovanović ZA, Nedeljković M. Influence of sodium bicarbonate and standard antidotes on acid-base status in rats poisoned with dichlorvos. *Jugoslov Med Biochem* 2004; 23(2): 165-170.
168. Stefanovic D, Antonijevic B, Bokonjic D, Stojiljkovic MP, Milovanovic ZA, Nedeljkovic M. Effect of sodium bicarbonate in rats acutely poisoned with dichlorvos. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98(2): 173-80.
169. Stojiljković N, Jovanović D, Radenković M, Veljković S, Ćirić M, Radovanović D. Promena aktivnosti enzima SDH u jetri i biohemijskih parametara u krvi pacova tretiranih gentamicinom. *Act med Median* 2002;6:31-37.
170. Sudakin DL, Mullins, ME, Horowitz BZ, Abshier V, Letzig L. Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. *Clinical Toxicology* 2000; 38 (1): 47-50.
171. Sungur M, Güven M. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Crit Care* 2001; 5 (4): 211–5.
172. Slauter RW. 18 month oral oncogenicity study in mice: Malathion. Lab. project No. 668-001. Unpublished study prepared by International Research and Development Corporation. Mattawan. MI. EPA MRID 43407201. Toxicological Profile for Malathion. US Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Public Health Service, Atlanta, 1994.
173. Sogorb MA, Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett* 2002; 128(1-3): 215-28.
158. Suntio L R, Shiu WY, Mackay D, Seiber JN, Glotfelty DE. Critical review of Henry's law constants for pesticides. *Rev Environ Contamin Toxicol* 1998; 103: 1-59.
128. Taysse L, Calvet JH, Buee J, Christin D, Delamanche S, Breton P. Comparative efficacy of diazepam and avizafone against sarin-induced neuropathology and respiratory failure in guinea pigs: influence of atropine dose. *Toxicol* 2003; 188: 197–209.
159. Taylor DM, Fernie K. Exposure to, and inactivation of the unconventional agents which cause transmissible degenerative encephalopathies. Transmissible subacute spongiform encephalopathies: practical aspects of agent inactivation. *Vet Microbiol* 1997; 11: 234-239.
160. Tsatsakis AM, Aguridakis P, Michalidimitrakis MN, Tsakalov AK, Alegakis AK, Koumantakis E, Troulakis G. Experiences with acute organophosphate poisonings in Crete. *Vet Hum Toxicol* 1996 ; 38(2): 101-7.

161. Toxicological Profile for Malathion. US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, 2008.
162. Tomlin CDS. In: The Pesticide Manual, A World Compendium. British Crop Protection Council, Alton, Hampshire, 2006: 642-643.
163. Van Helden HP, Groen B, Moor E, Westerink BH, Bruinzel PL. New generic approach to the treatment of organophosphate poisoning: adenosine receptor mediated inhibition of ACh release. *Drug Chem Toxicol* 1998; 21(1): 171-181.
164. Varagić V, Stevanović M. Farmakoterapija u pulmologiji. Medicinska knjiga Beograd-Zagreb, 1990.
165. Vučinić S, Todorović V, Potrebić O, Jović-Stošić J, Srnić D, Đorđević D, Babić G. Mehanička ventilacija u trovanju organofosfornim insekticidima. Zbornik radova 14. Savetovanja veterinara Srbije sa međunarodnim učešćem, Zlatibor, 2002; 329-331.
166. Vučinić S. Evaluation of pralidoxime methylsulphate effect in organophosphate insecticide poisoning: clinical controversies. Proceedings of CBMTS V, Spiez, Switzerland, 2004.
167. Vučinić S. Akutna trovanja pesticidima. *Urgantna medicina, „Obeležja“*, 2002; 1174-1184.
168. Vučinić S, Joksović D, Jovanović D, Vučinić Ž, Todorović V. Factors influencing the degree and outcome of acute beta-blockers poisoning. *Vojnosanit pregl* 2000; 619-623.
169. Vučinić S, Šegrt Z., Todorović B, Marković M. Paraquat poisoning: a case series. Programme and abstracts, XXV EAPCCT Congress, 2005.
170. Vučinić S, Todorović V, Đorđević D, Srnić D, Potrebić O, Jovanović M. Smrtnost u akutnim trovanjima insekticidima. Četvrta Beogradska konferencija o suzbijanju štetnih artropoda i glodara. Zbornik radova 2000; 211-217.
171. Vučinić S, Joksović D, Todorović V, Šegrt Z, Potrebić O, Jovanović M, Režić T, Đorđević D. Acute organophosphate insecticide poisoning: antidotes and intensive care management. EAPCCT Congress, Programme and abstracts. Rome, 2003.
172. Vučinić S., Jovašević-Stojanović, M., Vučinić, Ž., Šegrt, Z., Đorđević, D. Acute herbicide poisonings: the role of the National Poison Control Centre. International Conference on rural Health in Mediterranean and Balkan Countries, Bari 2002, Book of abstracts.
173. Vučinić S, Antonijević B, Zlatković M, Đorđević M, Jovanović M, Čurčić M, Kilibarda V, Bokonjić D. How have the latest trends in toxicology of organophosphates affected our clinical practice. Abstracts of the 47 th Congress of EUROTOX, Paris, 28-31 avgust 2011. *Toxicology Lett* 205S (2011) S36-S59: 0S10.

174. Wagner SL. Diagnosis and treatment of organophosphate and carbamate intoxication. *Occup Med State of the Art Reviews* Atlanta. 1997.
175. Watson WA, Litovitz TL, Rodgers GC, Klein Schwartz W, Reid N, Youniss J. Annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance. *Am J Emerg Med* 2005; 23: 589-666.
176. WHO. Environmental Health Criteria 63. Organophosphate Insecticides. General introduction. International programme of Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2010.
177. Weeks MH, Lawson MA, Angerhofer RA, Davenport CD, Pennington NE. Preliminary assessment of the acute toxicity of malathion in animals. *Arch Environl Contam Toxicol* 1977; 6: 23-31.
178. Weizman Z, Sofer S. Acute pancreatitis in children with anticholinesterase insecticide intoxication. *Pediatrics* 1992; 90: 204–6.
179. Willems JL, Belpaire, FM. Anticholinesterase poisoning: an overview of pharmacotherapy. In: *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates*. Eds. Ballantyne B, Marrs TC. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1992, pp. 536–542.
180. Wong A. In: Effects of sodium bicarbonate in human organophosphate pesticides poisoning in Brazil. Presented at the World Health Organization INTOX Meeting, Cardiff, Wales, UK., Sept 1996 (unpublished data).
181. Worek F, Becker M, Thiermann H, Szinicz L, Mast U, Klimmek R, Eyer P. Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16: 466–472.
182. Worek F, Kirchner T, Becker M, Szinicz L. Reactivation by various oximes of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus compounds. *Arch Toxicol* 1996; 70: 497–503.
183. Worek F, Kirchner T, Szinicz L. Effects of atropine and bispyridinium oximes on respiratory and circulatory function in guinea-pigs poisoned by sarin. *Toxicology* 1995; 95: 123–133.
184. Worek F, Kirchner T, Szinicz L. Effects of atropine, HLö 7 and HI-6 on respiratory and circulatory function in guinea-pigs poisoned by O-ethyl S-[2-(diisopropylamino) ethyl] methylphosphonotioate (VX). *Pharmacol Toxicol* 1994a; 75: 302–309.
185. Worek F, Kirchner T, Szinicz L. Treatment of tabun poisoned guinea-pigs with atropine, HLo 7 or HI-6: effect on respiratory and circulatory function. *Arch Toxicol* 1994b; 68: 231–239.

186. Worek F, Thiermann T, Szinicz L. Reactivation and aging kinetics of human acetylcholinesterase inhibited by organophosphonylcholines. *Arch Toxicol* 2004; 78: 212–217.
187. Zeid MMA, El Barouty G, Adbdel-Reheim E, Blancato J, Dary C, El Sebae AH. Malathion's disposition in dermally and orally treated rats and its impact on the blood serum acetylcholineesterase and protein profile. *J Environ Sci Health Part B* 1993; 28 (4): 413-430.
188. Zlatković M, Jovanović M, Djordjević D, Vučinić S. Brzo simultano određivanje organofosfornih pesticida u humanom serumu i urinu metodom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom. *Vojnosanit Pregl* 2010;67(9):717-722.
189. Umetsu N, Grose F.H, Allahyari R, Abu El Haj S, Fukuto Tr. Effect of impurities on the mammalian toxicity of technical malathion and acephate. *J Agric Food Chem* 1977; 25: 946-953.
190. Yoshida T. Sarin poisoning in Matsumoto Japan. *J Toxicol Sci* 1994; 9(3): 85-8.

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
KRAGUJEVAC**

UNIVERSITY OF

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
KRAGUEVAC
КРАГУЈЕВАЦ**

MEDICAL FAKULTY

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА
DOKUMENTATION
ИНФОРМАЦИЈА**

KEY WORDS

**Редни број :
РБР**

**Accession number :
ANO**

**Индентификациони број:
ИБР**

**Indentification number :
INO**

**Тип документације : Монографска
публикација
ТД**

**Document type: Monograph
publication
DT**

**Тип записа : Текстуални штампани
материјал
ТЗ**

**Type of records : Textual printed
material
TR**

**Врста рада : Докторска теза
ВР**

**Contetnts code : Ph.D. thesis
CC**

**Аутор : Мирослав Марковић
АУ**

**Autor : Miroslav Marković
AU**

**Ментор : Проф. др Драган Миловановић
МН**

**Mentor : Prof. dr. Dragan
Milovanović
MN**

**Наслов рада : Утицај натријум бикарбоната и
bicarbonate
стандардних антидота на ацидобазни статус
base
пацова акутно отрованих малатионом
with
НР**

**Title : Effect of sodium
and standard antidote on acid
status in rats acutely poisoned
malathion
TI**

**Језик публикације : Српски (ћирилица)
(cyrillic)**

ЈР

Language of text : Serbian

JR

Језик извода : Српски / Енглески

ЈИ

**Language of abstract : Serbian /
English**

LA

Земља публикавања : Србија

ЗР

Country of publication : Serbia

CP

Уже географско подручје : Шумадија

УГП

Година : 2011.

ГО

Locality of publication : Sumadia

LP

Publication year : 2011

PU

Издавач : ауторски репринт

ИЗ

Publisher : Author reprint

PU

Место и адреса : 11400 Младеновац

Михаила Миловановића 53

МА

Publication place : 11400 Mladenovac

Mihaila Milovanovica 53

PP

Физички опис рада :

ФО

Physical description :

PD

Научна област : Медицина

НО

Scientific field : Medicine

SF

**Научна дисциплина : Експериментална
фармакологија и токсикологија**

НД

**Scientific discipline : Experimental
pharmacology and toxicology**

SD

Предметна одредница/ кључне речи :

антидотска заштита, ацидоза,

bicarbonate

натријум бикарбонат, малатион. серумска

и еритроцитна ацетилхолинестераза

ПО

Subject / Key words : Antidote

protection, acidosis, sodium

malathion, serum and erythrocyte

acetylcholinesterase

SKW

УДК :

Чува се : У библиотеци Медицинског
факултета у Крагујевцу, 34000 Крагујевац
Светозара Марковића 60
ЧУ

Извод :
ИД

Развој ефикасних антидота у тровању ор­гано­фос­фор­ним једињењима пред­став­ља ко­стан­тан на­уч­но­ис­тра­живач­ки изазов већ неко­ли­ко де­це­ни­ја. тера­пи­ја акут­них тровања ор­гано­фос­фор­ним ин­сек­ти­ци­ди­ма, кон­вен­ци­она­лно се ба­зи­ра на при­ме­ни атро­пи­на, диа­зе­па­ма и ок­си­ма као спе­ци­фич­них и стан­дар­д­них ан­ти­дота. Иа­ко је про­шло ви­ше од по­ла ве­ка уво­ђе­ња пр­вог ре­ак­ти­ва­то­ра хо­ли­не­сте­ра­зе, ста­во­ви о ње­го­вој упо­тре­би још ни­су ле­че­ња акут­них тровања ор­гано­фос­фор­ним ин­сек­ти­ци­ди­ма, на ек­спер­имен­тал­ном и ху­маном, мо­делу пре­мда на ре­ла­тив­но ма­лом бро­ју па­ци­је­ната, про­уча­ван је и ин­фу­зи­они е­фе­кат на­три­јум би­кар­бо­ната као су­пор­тив­ног чи­ни­оца. Ре­зул­та­ти ових сту­ди­ја го­во­ре у при­лог на­ве­де­не ин­фу­зи­је на­три­јум би­кар­бо­ната у тера­пи­ји акут­ног тровања ор­гано­фос­фор­ним једињењима, уз на­уч­но об­јаш­ње­ње да се ен­до­гено по­ја­ча­ва хи­дро­ли­за мо­ле­ку­ла ор­гано­фос­фа­та и ње­го­ва бр­жа ели­ми­на­ци­ја ури­ном. Пред­ло­же­ни тера­пи­јски мо­дел при­ме­не на­три­јум би­кар­бо­ната у акут­ним тровањима ор­гано­фос­фор­ним ин­сек­ти­ци­ди­ма је ори­ги­на­лан и има за циљ да про­ве­ри ути­цај при­ме­не на­три­јум би­кар­бо­ната и по­сле­ди­чне ал­ка­ли­ни­за­ци­је кр­ви на де­гра­да­ци­ју и бр­зину ели­ми­на­ци­је ор­гано­фос­фор­них ин­сек­ти­ци­да, те ре­ак­ти­ва­ци­ју се­рум­ске и ери­тро­цит­не аце­тил­хо­ли­не­сте­ра­зе.

UDC :

Holding data : Library of Medical Faculty
Kragujevac, 34000 Kraguevac
Svetozara Markovica 60
HD

Abstract :
AB

Development of efficient antidotes in organic phosphorus compounds has been representing a constant scientific and research challenge for few decades now. Treating the acute organic phosphorus insecticides poisonings is conventionally based on application of atropine, diazepam, and oxims as specific and standard antidotes. Although it has passed almost half a century since implementation of the first reactivate cholinesterase, the points of view on its use haven't been coordinated. None of the tested oxims can be considered to be as a universally acute organic phosphorus insecticides poisonings, other therapeutic modalities are searched for. As an alternate way of treating acute organic phosphorus insecticides poisonings, on experimental and humane, model which is rather a small number of patients, an infusion effect of sodium bicarbonates as a supportive article has been studied. The organic phosphorus insecticides poisonings, on experimental and humane, model which is rather a small number of patients, an infusion effect of sodium bicarbonates as a supportive article has been studied. The view on its use haven't been coordinated. None of the tested oxims can be considered to be as a universally acute organic phosphorus insecticides poisonings, other therapeutic modalities are searched for. As an alternate way of treating acute phosphates is increasing endogenously and

is urine elimination. Suggested therapeutic module of application of sodium bicarbonates in treating the acute organic phosphorus insecticides poisonings is original and it aims to check the influence of application of sodium bicarbonates and circumstantial blood alkalization to degradation and organic phosphorus insecticides elimination velocity, and serum reactivation serum and erythrocyte acethylcholinesterase.

**Датум прихватања теме од стране НН већа:
ДП**

Accepted by Scientific Board on:

**Датум одбране
ДО**

**Чланови комисије :
КО
Преседник/ Пресидент**

Члан / Member

Члан / Member

Члан / Member

IX. ПРИЛОЗИ

Прилог 1. Пример гасних анализа (ABL 700) за контролну групу испитиваних пацова

RADIOMETER ABL 700 SERIES

ABL735 09:49:00 2008-05-26
 PATIENT REPORT Syringe - S 195uL Sample # 4938

Identifications

Patient ID vma - eksperiment
 Patient Last Name 1/k
 Patient First Name
 Sample type Arterial
 temp 37,0 °C

Blood Gas Values

↓ pH 7,049 [7,350 - 7,450]
 ↓ pCO₂ 39,6 mmHg [32,0 - 48,0]
 ↓ pO₂ 28,8 mmHg [83,0 - 108]

Oximetry Values

↓ ctHb 11,2 g/dL [12,0 - 17,5]
 ↓ sO₂ 25,8 % [95,0 - 99,0]
 ↓ FCO₂Hb 25,8 % [94,0 - 98,0]
 ↓ FCOHb 0,3 % [0,5 - 1,5]
 ↑ FHHb 73,6 % [0,0 - 5,5]
 FMetHb 0,5 % [0,0 - 1,5]

Metabolite Values

cGlu 4,1 mmol/L [3,5 - 6,1]
 ↑ cLac 8,2 mmol/L [0,5 - 1,6]
 ↓ ctBil 0 μmol/L [0 - 18]

Temperature Corrected Values

pH(T) 7,049
 pCO₂(T) 39,6 mmHg
 pO₂(T) 28,8 mmHg

Oxygen Status

ctO_{2c} 4,1 Vol%
 p50_c 42,53 mmHg

Acid Base Status

cBase(Ecf)_c -18,0 mmol/L
 cHCO₃(P,st)_c 9,5 mmol/L

Notes

↑ Value(s) above reference range
 ↓ Value(s) below reference range
 c Calculated value(s)

Printed 09:50:24 2008-05-28

RADIOMETER ABL 700 SERIES

ABL735 10:07:00 2008-05-26
 PATIENT REPORT Syringe - S 195uL Sample # 4

Identifications

Patient ID vma - eksperiment
 Patient Last Name 2/k
 Patient First Name
 Sample type Arterial
 temp 37,0 °C

Blood Gas Values

↓ pH 7,170 [7,350 - 7,450]
 ↓ pCO₂ 34,0 mmHg [32,0 - 48,0]
 ↓ pO₂ 43,9 mmHg [83,0 - 108]

Oximetry Values

↓ ctHb 11,2 g/dL [12,0 - 17,5]
 ↓ sO₂ 53,9 % [95,0 - 99,0]
 ↓ FCO₂Hb 52,5 % [94,0 - 98,0]
 ↑ FCOHb 1,8 % [0,5 - 1,5]
 ↑ FHHb 44,9 % [0,0 - 5,5]
 FMetHb 0,8 % [0,0 - 1,5]

Metabolite Values

cGlu 4,9 mmol/L [3,5 - 6,1]
 ↑ cLac 8,9 mmol/L [0,5 - 1,6]
 ↓ ctBil 0 μmol/L [0 - 18]

Temperature Corrected Values

pH(T) 7,170
 pCO₂(T) 34,0 mmHg
 pO₂(T) 43,9 mmHg

Oxygen Status

ctO_{2c} 8,3 Vol%
 p50_c 41,56 mmHg

Acid Base Status

cBase(Ecf)_c -14,9 mmol/L
 cHCO₃(P,st)_c 12,2 mmol/L

Notes

↑ Value(s) above reference range
 ↓ Value(s) below reference range
 c Calculated value(s)

Printed 10:08:38 2008-05-28

**Прилог 2. Пример гасних анализа (ABL 700) за групу отрованих испитиваних пацова
са 1LD₅₀ малатионом**

RADIOMETER ABL 700 SERIES

ABL 735 09:33:00 2008-05-29
PATIENT REPORT Syringe - S 195uL Sample # 4954

Identifications

Patient ID vma - eksperiment
Patient Last Name 2/m
Patient First Name
Sample type Arterial
temp 37,0 °C

Blood Gas Values

↓ pH 7,157 [7,350 - 7,450]
↓ pCO₂ 38,8 mmHg [32,0 - 48,0]
↓ pO₂ 29,3 mmHg [83,0 - 108]

Oximetry Values

ctHb 13,0 g/dL [12,0 - 17,5]
↓ sO₂ 23,6 % [95,0 - 99,0]
↓ FO₂Hb 23,5 % [94,0 - 98,0]
↓ FCOHb 0,1 % [0,5 - 1,5]
↑ FHb 76,1 % [0,0 - 5,5]
FMetHb 0,3 % [0,0 - 1,5]

Metabolite Values

cGlu 4,1 mmol/L [3,5 - 8,1]
↑ cLac 8,2 mmol/L [0,5 - 1,6]
↓ ctBil 0 μmol/L [0 - 18]

Temperature Corrected Values

pH(T) 7,157
pCO₂(T) 38,8 mmHg
pO₂(T) 29,3 mmHg

Oxygen Status

ctO_{2c} 4,3 Vol%
p50_c 45,05 mmHg

Acid Base Status

cBase(Ecf)_c -13,9 mmol/L
cHCO₃(P,et)_c 12,2 mmol/L

Notes

↑ Value(s) above reference range
↓ Value(s) below reference range
c Calculated value(s)

Printed 09:34:37 2008-05-29

RADIOMETER ABL 700 SERIES

ABL 735 09:36:00 2008-05-29
PATIENT REPORT Syringe - S 195uL Sample # 4954

Identifications

Patient ID vma - eksperiment
Patient Last Name 1/m
Patient First Name
Sample type Arterial
temp 37,0 °C

Blood Gas Values

↓ pH 7,170 [7,350 - 7,450]
↓ pCO₂ 39,4 mmHg [32,0 - 48,0]
↓ pO₂ 27,3 mmHg [83,0 - 108]

Oximetry Values

ctHb 11,5 g/dL [12,0 - 17,5]
↓ sO₂ 26,0 % [95,0 - 99,0]
↓ FO₂Hb 25,8 % [94,0 - 98,0]
↓ FCOHb 0,3 % [0,5 - 1,5]
↑ FHb 73,5 % [0,0 - 5,5]
FMetHb 0,4 % [0,0 - 1,5]

Metabolite Values

cGlu 5,0 mmol/L [3,5 - 8,1]
↑ cLac 7,9 mmol/L [0,5 - 1,6]
↓ ctBil 0 μmol/L [0 - 18]

Temperature Corrected Values

pH(T) 7,170
pCO₂(T) 39,4 mmHg
pO₂(T) 27,3 mmHg

Oxygen Status

ctO_{2c} 4,2 Vol%
p50_c 40,30 mmHg

Acid Base Status

cBase(Ecf)_c -13,1 mmol/L
cHCO₃(P,et)_c 12,9 mmol/L

Notes

↑ Value(s) above reference range
↓ Value(s) below reference range
c Calculated value(s)

Printed 09:37:29 2008-05-29



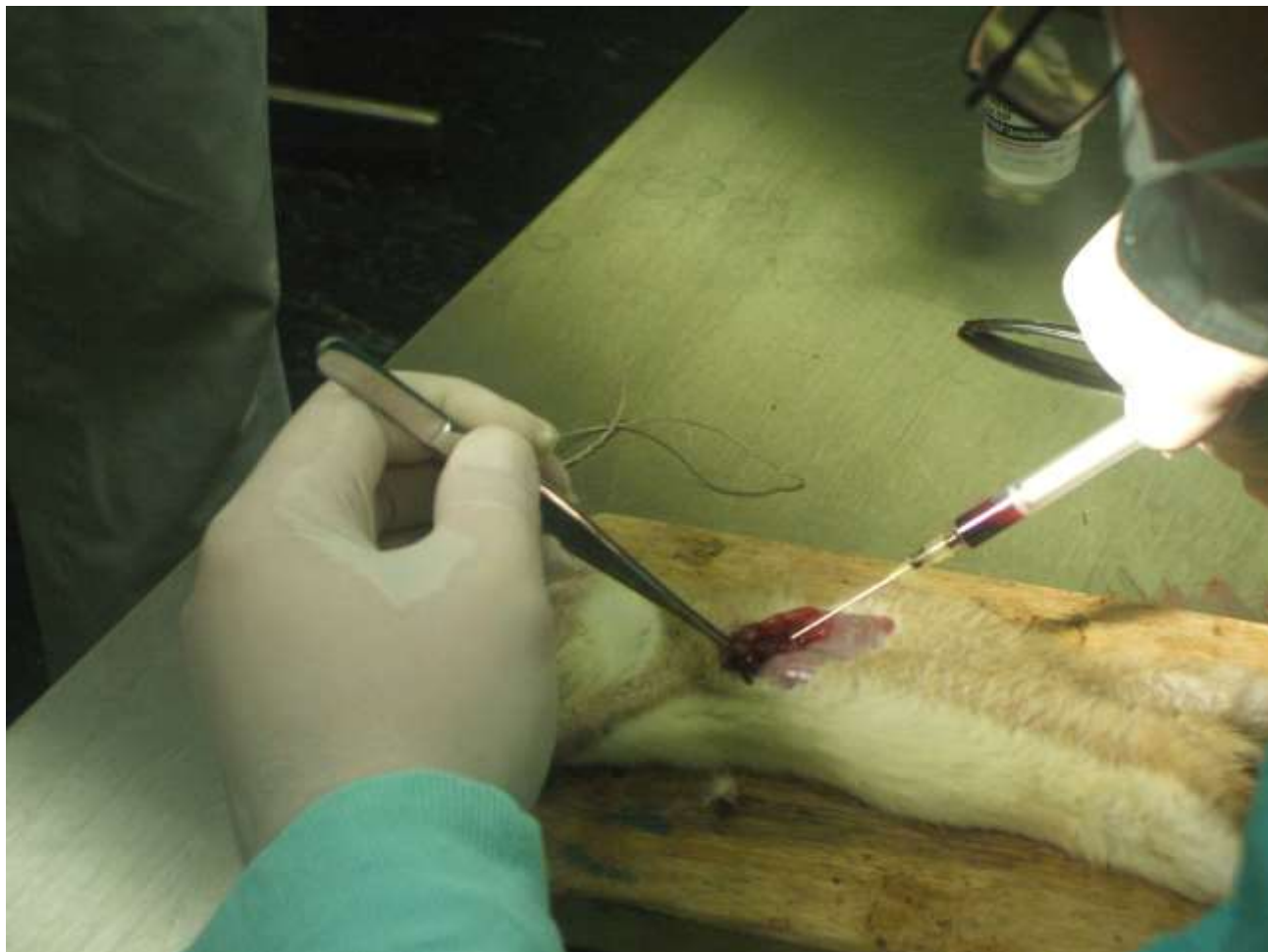
Слика 9.1. Торакотомија фиксираниог испитиваног пацова (дермално и субкутисно обострано хирушко отварање)



Слика 9.2. Интракардијална пункција леве коморе срца испитиваног пацова са хепанизираним шприцем и иглом (каудоветебрални преглед)



Слика 9.3. Интракардилана пункција леве коморе срца испитиваног пацова са хепанизираним шприцем и иглом (грудно фронтални преглед)



Слика 9.4. Интракардилана пункција леве коморе срца испитиваног пацова са хепанизираним шприцем и иглом (грудно латерални преглед)