

Извештај о завршеној докторској дисертацији  
ВС асист. мр сц. фарм. Милице Златковић, доставља.-

Сектору за школовање и НИР  
Научно-наставном већу

На 39. седници Наставно-научног већа Медицинског факултета Војномедицинске академије, одржаној 21. априла 2016. године, донета је одлука којом се одређује комисија за оцену готове докторске дисертације ВС асист. мр сц. фарм. Милице Златковић, специјалисте токсиколошке хемије из Одељења за токсиколошку хемију Института за токсикологију и фармакологију Центра за контролу тровања ВМА, под насловом „УТИЦАЈ ТЕРАПИЈСКЕ ПРИМЕНЕ НАТРИЈУМ ХИДРОГЕНКАРБОНАТА НА ТОКСИКОКИНЕТИКУ ОРГАНОФОСФОРНИХ ИНСЕКТИЦИДА КОД БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ ТРОВАЊЕМ“.

Ова докторска дисертација проистиче из НИ задатка МФВМА/2012-14 чији је назив „Процена ефикасности стандардних антидота и адјувантне терапије у акутним тровањима оргаонофосфорним инсектицидима“. Руководилац овог задатка била је проф. др сц. фарм. Славица Вучинић.

Након увида у достављени материјал и разговора са кандидатом, комисија у саставу:

1. ВС доц. др сц. фарм. Снежана Ђорђевић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду (ужа научна област – медицинска хемија) - ментор;
2. ВС проф. др сц. мед. Славица Вучинић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду (ужа научна област – фармакологија и токсикологија) – председник комисије;
3. ВС проф. др сц. мед. Јасмина Јовић-Стошић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду (ужа научна област –фармакологија и токсикологија) – члан комисије;
4. пк проф. др сц. мед. Зоран Шегрт, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду (ужа научна област – фармакологија и токсикологија) – члан комисије;
5. проф. др сц. фарм. Биљана Антонијевић, Фармацеутски факултет Универзитета у Београду (ужа научна област-токсикологија) – члан комисије;

подноси следећи извештај:

## ИЗВЕШТАЈ

### 1. Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација написана је на 141 страни и по својој структури садржи 16 слика, 29 табела, 33 графикона и 155 цитираних литературних података. Подељена је на следећа поглавља: увод, радна хипотеза, циљеви истраживања, материјал и методе, резултати, дискусија, закључци и литература.

### 2. Кратак опис постигнутих резултата

У овом раду испитивана је ефикасност примене инфузије натријум хидрогенкарбоната у комбинацији са стандардном антидотском терапијом у лечењу акутних тровања оренофосфорним инсектицидима: малатионом, диметоатом и диазиноном.

Ефикасност је испитивана на два начина:

- испитивање стабилности оренофосфорних инсектицида (малатиона, диметоата и диазинона) са променом рН вредности *in vitro*;
- *in vivo* испитивање ефикасности примене инфузије натријум хидрогенкарбоната код болесника са акутним тровањима овим инсектицидима.

Постављена је хипотеза:

Интравенска примена раствора натријум хидрогенкарбоната у комбинацији са стандардним антидотима (атропин/оксим/диазепам), код болесника лечених због акутног тровања ОФИ, доводи до убрзане разградње отрова и бољег клиничког тока и исхода тровања у односу на болеснике третиране само стандардним антидотима.

На основу изложене хипотезе, код болесника лечених због акутног тровања ОФИ стандардним антидотима (атропин/оксим/диазепам) са или без додатка натријум хидрогенкарбоната, у одговарајућим временским интервалима, потребно је било извршити следеће циљеве истраживања:

- У *in vitro* условима испитати утицај рН на хидролизу оренофосфорних једињења.
- одредити концентрације ОФИ и њихових метаболита у крви и урину;
- у крви одредити вредности рН, концентрацију стандардног хидрогенкарбоната ( $\text{HCO}_3^-$  (st)), вредности актуелног базног ексеса (АВЕ), као и вредности парцијалног притиска угљен диоксида ( $\text{pCO}_2$ ), парцијалног притиска кисеоника ( $\text{pO}_2$ ), и сатурацију кисеоником ( $\text{sO}_2$ );

- одредити активност ацетилхолинестеразе (АChE) и бутирилхолинестеразе (BuChE);
- пратити виталне параметре (артеријски крвни притисак, срчана фреквенција и телесна температура), количину употребљених антидота, број дана на механичкој вентилацији, број дана хоспиталног лечења и морталитет.

Статистички упоредити добијене вредности праћених параметара (клиничких и лабораторијских) између болесника који су уз стандардне антидоте били третирани и натријум хидрогенкарбонатом и оних лечених само стандардним антидотима.

Истраживање је дизајнирано као рандомизована, двоструко слепа, проспективна моноцентрична клиничка студија. Обављено је у Центру за контролу тровања ВМА.

*In vitro* експеримент. Праћење токсикокинетике малатиона, диметоата и диазинона у бикарбонатном пуферу извршено је при различитим рН вредностима у распону од рН =7,35 до рН =7,55. За свако једињење одређена је стабилност у концентрацији од 5,0 mg/L. Одређивање концентрације ових једињења извршено је UPLC/MS методом. Овим експериментом показано је да мале промене рН вредности, од само 0,2 јединице, убрзавају разградњу малатиона са 68% при рН 7,35 на 81% при рН 7,55 у току 48 сати, односно са 81,2% на 99,8% код диметоата при истим рН вредностима. Насупрот томе, повећање рН вредностима смањује стабилност диазинона, што је у складу са његовом хемијском структуром.

У испитивање су били укључени болесници са акутним тровањем ОФИ, примљени на лечење у Клинику за ургентну и клиничку токсикологију Центра за контролу тровања ВМА (ЦКТ-ВМА) који, према *Poisoning Severity Score* (PSS), имају умерен до тежак степен тровања (PSS 2-3).

Болесници су, по доласку у Клинику, случајним избором били подељени у 2 групе: Тест група: болесници који су у терапији, поред стандардних антидота (атропин/оксим/диазепам), примали и натријум хидрогенкарбонат. Контролна група: болесници који су у терапији примали само стандардне антидоте (атропин/оксим/диазепам).

Из студије су били искључени пацијенти са од раније познатим обољењима која могу утицати на ацидобазни статус (хронична бубрежна инсуфицијенција и хронична болест плућа).

Натријум хидрогенкарбонат је примењиван током 48 сати. Иницијална доза (доза оптерећења) од 4 mmol/kg и.в. била је примењена током једног сата, а затим је настављено са дозом одржавања од 4 mmol/kg/24 сата континуираном и.в.

инфузијом до краја терапије, односно док је органофосфорни инсектицид детектован у биолошком материјалу.

За одређивање концентрације ОФИ и њихових метаболита, узорковање крви и урина у тест групи вршено је пре почетка примене натријум хидрогенкарбоната и стандардних антидота, на сваких 6 сати током примене натријум хидрогенкарбоната, а потом и на сваких 24 сата до престанка стандардне антидотске терапије. У контролној групи узорковање је вршено у одговарајућим временским интервалима који су били истоветни интервалима узорковања у тест групи. Одређивање концентрације ових једињења извршено је UPLC/MS методом.

У тровањима малатионом, статистички значајно мање концентрације метаболита малатиона (малаоксона и МСА) у тест групи у односу на контролну забележене су у 24. и 30. сату. Такође, полувремена елиминације малатиона и МСА у тест групи била су статистички значајно краћа (износила су 4,4 и 2,2h), у односу на контролну где су ове вредности износиле 6,8 и 9,6 h.

Концентрације алкил фосфата у урину биле на нешто вишем нивоу у тест групи. Статистичка значајност за DMTP и DMPTP је забележена у 24. сату (1:3; 1:1,5;  $p < 0,05$ ).

Код тровања диметоатом, полувреме елиминације диметоата из крви у тест групи износило је 18,4 h, што је значајно краће од истог параметра у контролној групи (25,3h).

Статистички значајно веће концентрације алкил фосфата (DMP) у урину забележене су у 12. и 18. сату у тест групи.

У тровањима диазиноном нису забележене значајне разлике у мереним параметрима у контролној и тест групи.

Узорковање крви за одређивање концентрација BuChE и AChE извршено је на пријему болесника у болницу, после 30 минута, 1 сат, два сата, даље у интервалима од 6 сати током трајања примене антидотске терапије и на сваких 24 сата од момента прекида примене антидотске терапије.

Вредности AChE у тест групи болесника са тровањима малатионом на пријему биле су нешто ниже у односу на контролну групу. На крају лечења ове вредности су биле веће у односу на контролну, али разлика није била статистички значајна. Статистички значајне разлике у вредностима активности AChE и у тровањима диметоатом и диазиноном такође нису забележене.

Када је у питању BuChE, очуваност активности ензима у тровањима малатионом од пријема до краја лечења била је боља код болесника лечених натријум хидрогенкарбонатом, али није била статистички значајна. Код тровања диметоатом активност BuChE била је нешто већа у контролној у односу на тест групу, али

такође без статистичке значајности. У тровањима диазиноном, активност BuChE била је веома ниска у обе групе, без статистички значајних разлика.

Мерење вредности рН, концентрације хирогенкарбоната ( $\text{HCO}_3^-$ ), као и вредности  $\text{pO}_2$  и  $\text{pCO}_2$  у тест групи болесника лечених због акутног тровања ОФИ, извршено је пре почетка примене натријум хидрогенкарбоната и на сваких 6 сати током примене натријум хидрогенкарбоната. У контролној групи болесника мерење ових вредности је извршено у одговарајућим временским интервалима истоветним онима у тест групи. Одређивање свих параметара урађено је стандардним лабораторијским методама.

Код тровања малатином и диметоатом, у свим периодима након почетног, артеријске рН вредности у тест групи биле су значајно више у поређењу са контролном. Код тровања диазиноном, рН вредности у тест групи биле су статистички значајно веће након 6 и 12 сати од пријема.

Средње вредности концентрација бикарбоната у крви код обе групе болесника на пријему за сва три токсична агенса биле су уједначене. Статистички значајан пораст концентрација у тест групи у односу на контролну забележен је након 6 и 12 сати од пријема и износио је  $+7,8 \text{ mmol/L}$ , односно  $+4,13 \text{ mmol/L}$ . У преосталим праћеним временским пресецима били су слични у обе групе.

Мониторинг виталних параметара (артеријски крвни притисак, фреквенција рада срца, број респирација, телесна температура), спровођен је континуирано током трајања хоспитализације уз регистровање вредности најмање на сваких 6 сати.

Свакодневно је регистрована потрошња атропина, трајање механичке вентилације и хоспитализације, као и исход тровања. Иако је количина примењеног атропина, као и дужина примене пралидоксима у тест групи у односу на контролну била мања, статистичка значајност није забележена. Статистички значајна разлика међу групама забележена је у броју дана на механичкој вентилацији који је у контролној групи износио 6,74 дана, а у тест групи 2,64 дана, док је дужина хоспитализације била гранично значајна (тест група 11,68 дана, контролна група 16,25 дана).

## **1. Оцена резултата истраживања**

Органофосфорни инсектициди (ОФИ) имају широку примену у целом свету, и док је број жртава акциденталног тровања релативно мали, намерна самотровања достигла су велике размере, посебно у земљама у развоју. Према подацима Светске здравствене организације на годишњем нивоу се региструје 3.000.000 тровања ОФИ од којих се преко 300.000 заврши фатално.

Терапија акутних тровања ОФИ, поред деконтаминације (детоксикације) и супортивних мера, укључује примену антидота: парасимпатиколитика (атропин), реактиватора холинестеразе (оксим) и антиконвулзива (диазепам).

Један од разлога незадовољавајуће ефикасности садашњих антидота у терапији тровања ОФ инсектицидима је и њихово дуготрајно задржавање у организму. Наиме, они због липосолубилности стварају депое у масном ткиву, одакле затим постепено прелазе у системску циркулацију и доводе до продужене интоксикације. Из тих разлога је у последње време дошло до развоја новог концепта у терапији тих тровања који се заснива на адјувантној примени једињења која би спречила њихово задржавање у организму. У том смислу, досадашњи резултати са натријум хидрогенкарбонатом указују на могућност његове примене као адјуванса постојећим антидотима у тровању ОФИ.

Резултати спроведених испитивања на болесницима са тровањима ОФИ показују да натријум хидрогенкарбонат убрзава елиминацију малатиона и диметоата преко скраћења њихових полувремена елиминације.

Такође, резултати овог истраживања показују да је примена натријум хидрогенкарбоната у болесника трованих ОФИ довела до статистички значајно смањене потребе за механичком вентилацијом и гранично статистички значајно мање дужине хоспитализације у поређењу са групом болесника код којих он није био примењен.

Планирана испитивања пружају целовитији увид у терапијски потенцијал натријум хидрогенкарбоната као адјуванса у терапији акутних тровања ОФИ. Са научне тачке гледишта, ова испитивања су значајна јер омогућавају детаљније сагледавање механизма повољног дејства натријум хидрогенкарбоната у овим тровањима, а са практичне стране, добијени резултати обезбеђују доказе о оправданости његове примене у тим случајевима.

Са војног становишта, резултати ће бити применљиви у терапији тровања нервним бојним отровима, обзиром да они хемијски припадају групи ОФ једињења, тј. иреверзибилним инхибиторима ацетилхолинестеразе.

## 2. Закључак

- Повећање рН вредности бикарбонатног пуфера *in vitro* доводи до убрзане разградње малатиона и диметоата, али не и диазинона.
- Полувреме елиминације малатиона и диметоата из крви болесника са тровањима овим ОФИ након примене натријум хидрогенкарбоната у комбинацији са стандардном терапијом краће је у односу на полувреме елиминације ових супстанци након примене само стандардне терапије. Примена натријум хидрогенкарбоната нема утицаја на брзину елиминације диазинона.

- Примена натријум хидрогенкарбоната убрзава елиминацију малатиона и диметоата, услед скраћења полувремена елиминације малатионкарбоксилне киселине (МСА) из крви и повећање концентрације алкилфосфата (DMP; DMTP и DMDTP) у урину болесника који су лечени натријум хидрогенкарбонатом.
- Терапијска примена натријум хидрогенкарбоната није значајно утицала на ниво активности АChE и BuChE.
- Потрошња антидота (количина атропина и дужина примене пралидоксима) била је мања код болесника лечених натријум хидрогенкарбонатом у односу на контролну групу, без статистички значајне разлике. Број дана на механичкој вентилацији био је значајно краћи ( $p < 0,05$ ), и дужина хоспитализације гранично значајно краћа ( $0,1 > p > 0,05$ ) код болесника који су уз стандардну антидотску терапију лечени натријум хидрогенкарбонатом.
- Од лабораторијских параметара, натријум хидрогенкарбонат је значајно повећавао рН крви, без негативног секундарног утицаја на респираторни статус.
- Натријум хидрогенкарбонат као адјувант би требало редовно користити у тровању ОФИ (диметоатом и малатионом) јер су његова позитивна дејства евидентна, а да при томе не испољава практично никаква нежељена дејства. У сваком случају даља судбина примене натријум хидрогенкарбоната у рутинској пракси зависиће од убедљивости његових ефеката код далеко већег броја тровања.

Предлажемо Научно-наставном већу ВМА да прихвати овај рад као завршену докторску дисертацију и одобри њену јавну одбрану.

### 3. Објављени резултати који чине део рада

Zlatković M, Jovanović M, Đorđević D, Vučinić S. Brzo simultano određivanje organofosforних pesticida u humanom serumu i urinu metodom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom. *Vojnosanit Pregl* 2010; 67(9): 717-722.

Vučinić S, Zlatković M, Antonijević B, Ćurčić M, Bošković B. Fresh frozen plasma as a successful antidotal supplement in acute organophosphate poisoning. *Arch of Ind Hygiene and Toxicol* 2013 June; 64(2):87-91. (IF=1,048).

Vučinić S, Antonijević B, Ilić N, Ilić T. Oxime and atropine failure to prevent intermediate syndrome in acute organophosphate poisoning. *Vojnosanit pregl* 2013; 70(4):420-424.(IF=0,179)

Zlatković M, Krstić N, Subota V, Bošković B, Vučinić S. Determination of reference values of acetyl and butyryl cholinesterase activities in Serbian healthy population. VSP prihvaćen rad za štampu (potvrda).

У Београду, 10.05.2016.

Чланови комисије:

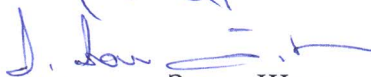


ВС доц. др сц. фарм. Снежана Ђорђевић



ВС проф. др сц. мед. Славица Вучинић

ВС проф. др сц. мед. Јасмина Јовић-Стошић



пк проф. др сц. мед. Зоран Шегрт



проф. др. сц фарм. Биљана Антонијевић