

**ДЕЙСТВИЕ КАРБОКСИМА НА ИЗОЛИРОВАННУЮ ГЛАДКУЮ МЫШЦУ
ТРАХЕИ КОШКИ В УСЛОВИЯХ ИНГИБИРОВАНИЯ
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЗОМАНОМ И VX**

Нечипоренко С.П., Саноцкий В.И., Шабунова И.А.

ФГУН "Институт токсикологии" ФМБА России,

Санкт-Петербург, ул. Бехтерева д.1

телефон (812)365-0680, E-mail: antidote@sf.ru

Резюме

Изучено действие реактиватора ацетилхолинэстеразы (АХЭ) карбоксима на холинергическое синаптическое проведение в гладкой мышце трахеи кошки *in vitro* при воздействии фосфорорганических ингибиторов зомана и VX. Установлено, что в концентрации 10^{-6} - 10^{-5} М карбоксим проявляет свойства обратимого ингибитора АХЭ, а в более высоких концентрациях выявляется его М-холинолитическая активность с $K_d 5 \cdot 10^{-5}$ М. Способность карбоксима устранять спонтанное сокращение гладкой мышцы, вызванное зоманом и VX, усиливается при предварительном введении обратимого ингибитора АХЭ аминостигмина. Сочетание свойств реактиватора, обратимого ингибитора и М-холинолитика играет важную роль в высокой защитной активности карбоксима при отравлении фосфорорганическими отравляющими веществами.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, реактиваторы, М-холинорецепторы, фосфорорганические ингибиторы, зоман, VX, antidotes

**THE ACTION OF CARBOXIME ON ISOLATED SMOOTH MUSCLE OF THE CAT'S
TRACHEA IN CONDITIONS OF ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION BY
SOMAN AND VX**

Nechiporenko S.P., Sanotsky V.I., Shabunova I.A.

Abstract

The action of carboxime, reactivator of acetylcholinesterase (AChE), on cholinergic transmission was studied in the cat's smooth muscle preparation of trachea exposed to organophosphate AChE inhibitors soman and VX. It was found that carboxime at concentrations

10^{-6} - 10^{-5} M proposed the features of reversible AChE inhibitor, and at high concentrations revealed of cholinergic M-antagonist activity with K_d $5 \cdot 10^{-5}$ M. The pretreatment with the reversible inhibitor AChE aminostigmine increases the ability of carboxime to eliminate the spontaneous contractions of smooth muscles caused by soman and VX. The reactivator, reversible inhibitor and M-cholinolytic properties in complex play the important role in high antidote efficacy of carboxime to organophosphate poisoning.

Keywords: acetylcholinesterase, reactivators, muscarinic receptors, organophosphates, soman, VX, antidotes

Введение

В настоящее время, не смотря на принятие Конвенции по запрещению разработки, производства и применения химического оружия, запасы отравляющих веществ остаются значительными. США и Россия, обладающие наибольшими запасами химического оружия, уже приступили к его уничтожению [1]. Однако, процессы уничтожения химического оружия чреваты возникновением аварийных ситуаций, которые могут сопровождаться выбросом в окружающую среду отравляющих веществ или продуктов их деструкции [1]. Из всего арсенала отравляющих веществ наибольшую опасность, в силу своих физико-химических и токсикологических свойств, представляют высокотоксичные фосфорорганические отравляющие вещества (ФОВ) [2].

При террористических актах в Японии с использованием зарина (1994 и 1995 гг.) в токийском метро пострадало 650 человек [3]. Возможность того, что в последующем террористами будут использованы именно ФОВ, определяет актуальность разработки эффективных антидотов этих ядов.

В настоящее время для лечения отравлений ФОВ используют М-холинолитики и реактиваторы ацетилхолинэстеразы (АХЭ), в частности, карбоксим, проявивший себя как весьма эффективный антидот [4-6]. Карбоксим относится к ряду бисчетвертичных соединений, содержащих одну оксимную группу. Установлено, что наряду со способностью восстанавливать активность фосфорилированной АХЭ, этот препарат обладает свойствами обратимого ингибитора фермента [7]. В то же время его фармакологические свойства остаются малоизученными.

Цель исследования

Изучение действия карбоксима на М-холинергическое проведение в гладкой мышце трахеи кошки при воздействии фосфорорганических ингибиторов АХЭ зомана и VX.

Материалы и методы

Опыты проводились на изолированных полосках гладкой мышцы трахеи кошки. Трахея выделялась у животных, находящихся под эфирным наркозом, и помещалась в физиологический раствор на 60 минут. Затем из очищенной от соединительной ткани трахеи готовились полоски, шириной, соответствующей одному хрящевому кольцу. Кольцо разрезалось с вентральной стороны, снималась *tonica fibrosa*, и препарат помещался в экспериментальную камеру из органического стекла. Один конец хрящевого кольца жестко фиксировался, а другой прикреплялся к механотрону типа 6Мх9Б так, что препарат *m. trachealis* оказывался расположенным горизонтально дорзальной поверхностью наружу. Через экспериментальную камеру объемом 2 мл осуществлялся проток физиологического раствора Кребса, следующего состава (ммоль/л) NaCl - 149; KCl - 5; MgSO₄ - 1; NaHCO₃ - 1; CaCl₂ - 2; KH₂PO₄ - 1,2; CaCl₂ - 2; глюкоза - 6. Раствор в камере постоянно аэрировался карбогеном (95 % - O₂; 5 % - CO₂) и термостатировался. Эксперименты выполнялись при температуре омывающих мышцу растворов 37,5±0,5°C и pH=7,3-7,4.

Перед началом эксперимента мышца выдерживалась 30 мин в экспериментальной камере при исходном натяжении 0,3 г, что составляло около 1/10 максимально развиваемого напряжения. Регистрация механических ответов производилась в изометрическом режиме с помощью механотрона с записью на самописце (рис. 2).

В качестве агонистов использовались ацетилхолин (АХ) и карбахолин (КХ). Снимались кумулятивные кривые доза-эффект для расчета ЕС₅₀. Для оценки блокирующего влияния реактиваторов на постсинаптические рецепторы использовался показатель рА₂ [8].

В экспериментах использовались концентрации ингибиторов АХЭ (зоман или VX) 10⁻⁷ и 10⁻⁶ г/мл, вызывающие 100%-ное угнетение АХЭ и максимальный сократительный ответ за 30 и 15 мин. Соответственно (рис. 2). В качестве характеристики блокирующего действия реактиватора на спонтанный сократительный ответ гладкой мышцы трахеи использовался показатель IC₅₀ - концентрация реактиватора, вызывающая 50 % - уменьшение тонуса мышцы. Структурная формула карбоксима представлена на рис. 1.

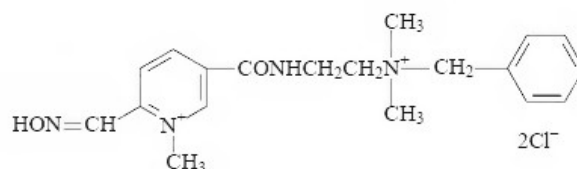


Рис. 1 Структурная формула карбоксима

Для синаптического ортодромного раздражения применялась полевая электростимуляция через платиновые электроды с частотой 20 имп./с супрамаксимальными стимулами 50-60/с длительностью 0,3 мс. Такие параметры стимуляции обеспечивали не прямое раздражение мышцы и появление быстрых фазных сокращений. В каждой серии экспериментов использованы данные не менее чем по 10 нервно-мышечным препаратам. Все расчеты и статистическая обработка проводились с использованием MS Excel. Все приводимые эффекты достоверны на уровне 95 %.

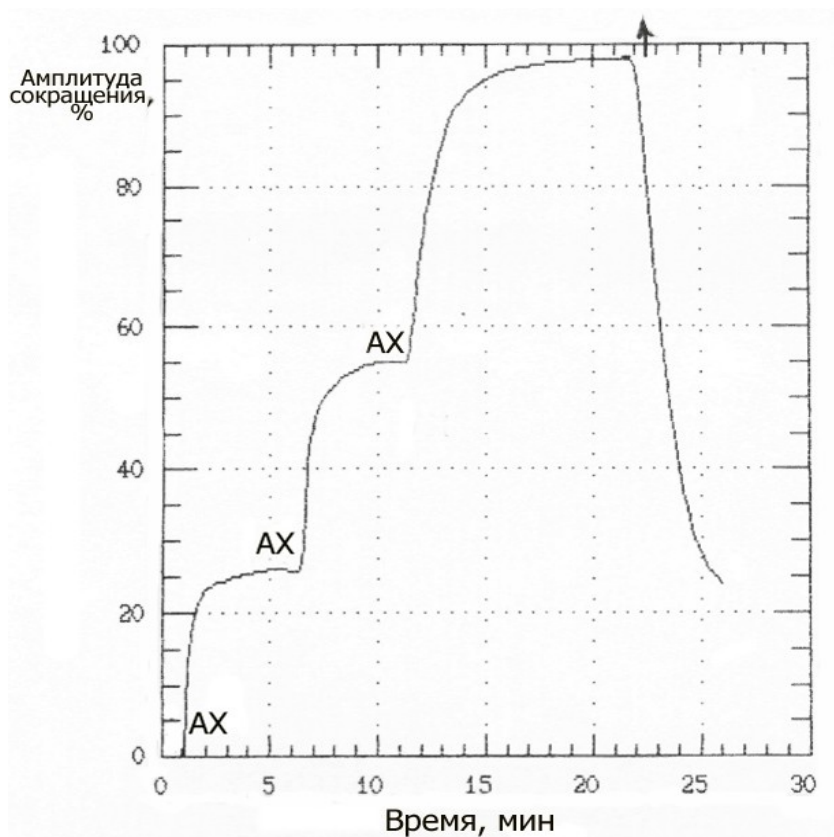


Рис. 2. Сократительные ответы гладкой мышцы трахеи кошки на экзогенный АХ
Кумулятивная кривая “концентрация-эффект”.

Результаты исследования

Сократительные ответы гладкой мышцы трахеи кошки на эндо- и экзогенный ацетилхолин, карбахолин и ФОВ регистрировались *in vitro*. Введение в омывающий раствор ингибиторов АХЭ вызывало развитие стойкого спонтанного сокращения гладкой мышцы трахеи. При этом на несколько порядков возрастала эффективность экзогенного АХ. При полном ингибировании активности АХЭ зоманом или VX реакция мышцы на экзогенный АХ качественно не изменялась, но существенно росла эффективность АХ, что отражалось в снижении EC_{50} АХ более чем на два порядка. EC_{50} карбахолина под действием ингибиторов АХЭ не изменялась.

Ответы на эндогенный АХ при синаптической активации гладкой мышцы трахеи равноценной электростимуляцией также возрастали при угнетении активности АХЭ зоманом или VX, что отражалось в увеличении амплитуды и длительности фазных сокращений (рис. 3).

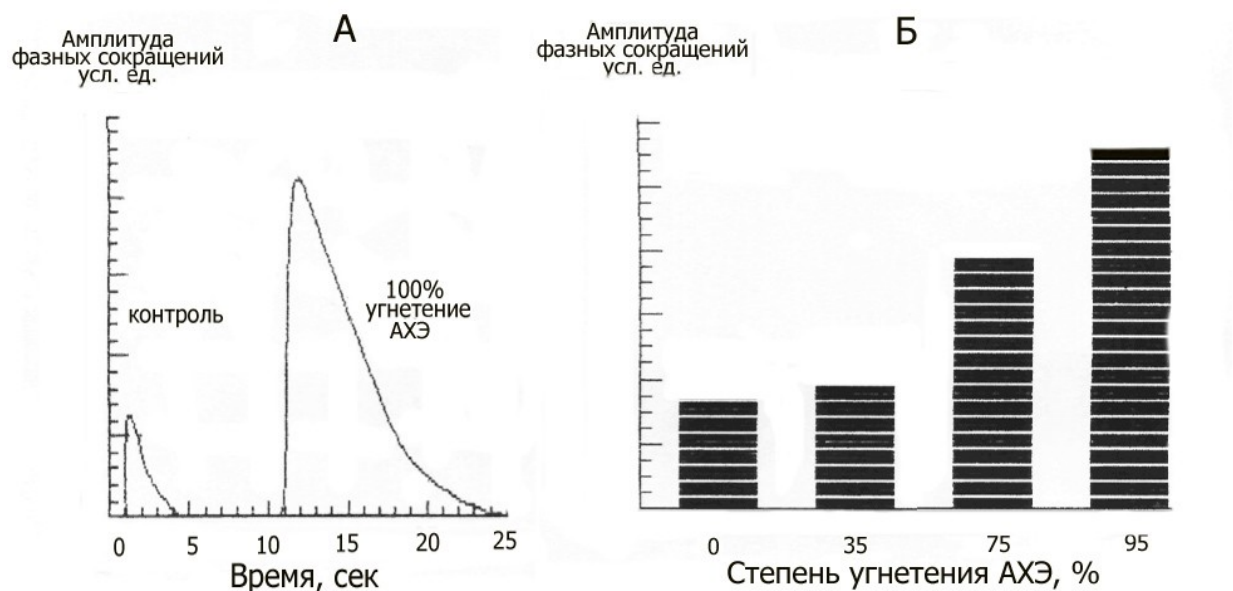


Рис. 3. Сократительные ответы гладкой мышцы трахеи кошки на эндогенный АХ

А - фазные сокращения при синаптической активации с частотой 20/с

Б - зависимость амплитуды фазных сокращений в % к контролю от степени угнетения активности АХЭ веществом VX

Эффекты карбоксима на сократительные ответы гладкой мышцы трахеи кошки при использовании экзогенных агонистов изучены на интактных препаратах гладкой мышцы. В концентрации 10^{-6} моль/л карбоксим не вызывал достоверного изменения чувствительности к АХ. EC_{50} составляла $(4,7 \pm 0,75) \cdot 10^{-8}$ М, что соответствовало контрольному значению. При повышении концентрации от 10^{-6} до 10^{-5} М EC_{50} АХ несколько снижалась, затем росла, а при концентрации 10^{-3} М вторично падала. Такое поведение объясняется, видимо, сочетанием у карбоксима свойств обратимого ингибитора АХЭ и антагониста М-ХР, поэтому корректная оценка антагонистических свойств карбоксима по эффектам АХ неправомерна.

Оценка действия карбоксима на постсинаптические рецепторы интактной мышцы трахеи производилась по изменению реакций на экзогенный КХ в присутствии различных концентраций реактиватора.

Исходное значение EC_{50} КХ составляло $(4,85 \pm 0,46) \cdot 10^{-7}$ моля. При концентрациях карбоксима, превышающих 10^{-6} моль/л, чувствительность к КХ начинала снижаться. При концентрации 10^{-3} М EC_{50} КХ падала более чем в 20 раз. На рис. 4 в логарифмическом масштабе концентраций [8] отложена зависимость отношения EC_{50} КХ, $pA_2 = 4,31 \pm 0,89$.

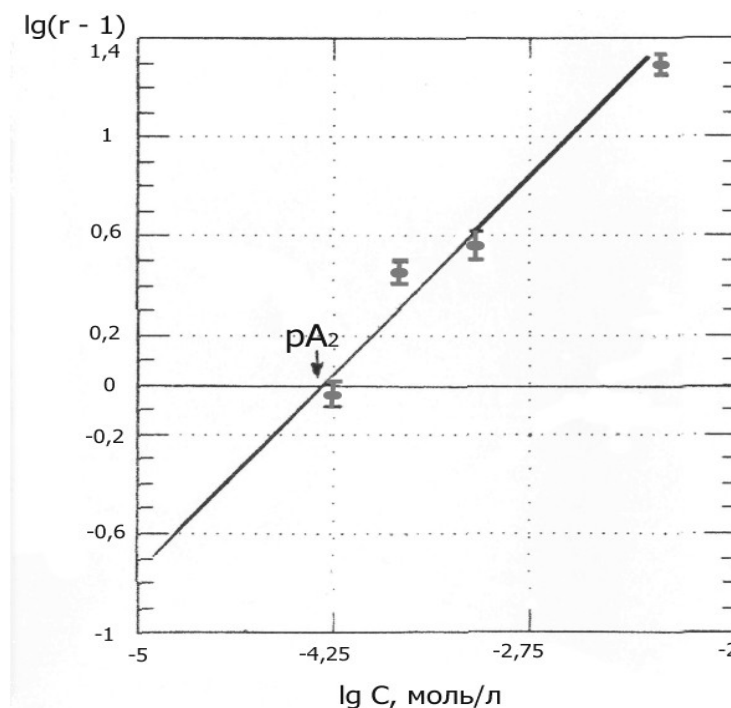


Рис. 4. Зависимость EC_{50} КХ от концентрации карбоксима

На оси абсцисс - логарифм концентрации карбоксима; на оси ординат - $\lg(r - 1)$, где r - отношение EC_{50} КХ в присутствии реактиватора к EC_{50} КХ в контроле

Поскольку наклон зависимости близок к единице ($B=1,02\pm0,15$), можно считать, что pA_2 соответствует логарифму константы диссоциации антагониста (K_d). Значение K_d реактиватора в этом случае численно равно $(5,0\pm0,8)\cdot10^{-5}$ М.

Для исследования постсинаптического действия карбоксима в препаратах с инактивированной АХЭ эксперименты проводились с использованием зомана в качестве ингибитора в концентрациях 10^{-5} г/мл (15 мин) или 10^{-7} г/мл (30 мин). В этих условиях достигалось полное угнетение активности фермента и развивался максимальный сократительный ответ. После достижения максимального тонуса препарат выдерживался ещё 15 мин. при температуре $37,5^{\circ}\text{C}$, чем достигалось "старение" фосфорилированной АХЭ, и тем самым исключалась возможность реактивации при добавлении в раствор карбоксима. В диапазоне действующих концентраций карбоксима спонтанный тонус быстро снижался (менее 10 мин) с выходом на плато. Установившийся уровень тонуса выражался в процентах к исходному максимальному ответу (100%). Реактиватор добавлялся последовательно в возрастающих концентрациях. Зависимость величины тонуса от логарифма концентрации карбоксима была линейной (рис. 5). Коэффициент корреляции составлял $0,96\pm0,2$; $IC_{50} - (1,02\pm0,08)\cdot10^{-4}$ М.

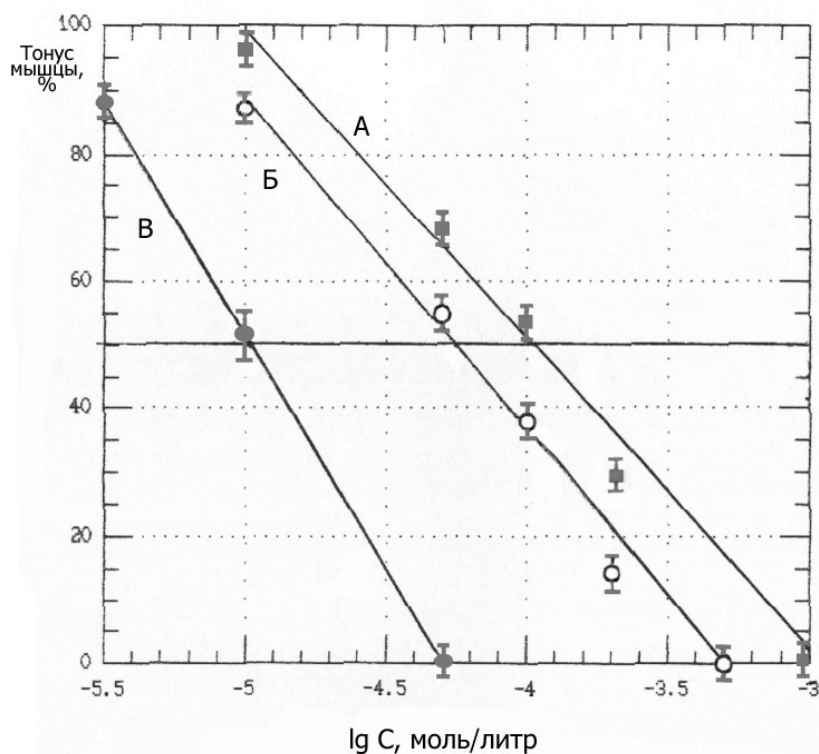


Рис. 5. Зависимость величины тонуса гладкой мышцы трахеи кошки от концентрации карбоксима

По оси абсцисс - логарифм концентрации реактиватора, по оси ординат - тонус мышцы в % к максимальному сокращению.

А - карбоксим на фоне 100%-ного угнетения АХЭ зоманом, $IC_{50} (1,2 \pm 0,08) \cdot 10^{-4} M$;

Б - карбоксим на фоне 100%-ного угнетения АХЭ веществом VX; $IC_{50} (5,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-5} M$

В - карбоксим на фоне 100%-ного угнетения АХЭ веществом VX с предварительной обработкой аминостигмином, $IC_{50} (1,1 \pm 0,08) \cdot 10^{-5} M$

В опытах по исследованию устранения тонуса мышцы, вызываемого VX, также установлено, что карбоксим оказывает постсинаптическое блокирующее действие. $IC_{50} = (5,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-5} M$, что достоверно ниже IC_{50} в тесте снятия тонуса, вызванного зоманом (рис.2.3). В этой серии экспериментов карбоксим добавлялся в раствор после удаления избытка VX на фоне полного ингибирования АХЭ. Повышение эффективности спазмолитического действия карбоксима, по сравнению с аналогичными экспериментами с зоманом, несомненно объясняется реактивацией ХЭ. Однако, оценить количественно вклад реактивации в такой постановке опыта нельзя, так как измерение сократительной реакции производилось в присутствии реактиватора, который сам обладает свойствами

обратимого ингибитора ХЭ в концентрациях, превышающих 10^{-5} моль/л. Поэтому в ряде экспериментов после добавления последней концентрации карбоксима ($5 \cdot 10^{-4}$ М), которая блокировала сократительный ответ полностью, производилось отмывание реактиватора и измерение активности АХЭ путем сравнения EC_{50} АХ в опыте и контроле. Остаточное ингибирование АХЭ составляло, как правило, 15-20%. Заметим, что аналогичные оценки активности АХЭ в опытах, где ингибирование осуществлялось зоманом, всегда давали 100 %-ное угнетение активности фермента.

Эффекты карбоксима на фазные сократительные ответы гладкой мышцы трахеи кошки изучены при непрямой электростимуляции с частотой 20 имп./с. При такой стимуляции мышца трахеи отвечает устойчивым сокращением, амплитуда которого составляла в наших опытах $20,3 \pm 2\%$ от максимального ответа на аппликацию экзогенного АХ. Ответ полностью блокировался атропином, что подтверждает холинергическую природу нервно-мышечной передачи в данном препарате. В качестве дополнительного контроля мы использовали тетродотоксин, который избирательно блокирует нервное проведение.

Карбоксим в концентрациях 10^{-7} и 10^{-6} М вызывал снижение амплитуды фазных сокращений до $60 \pm 5\%$ и $78,5 \pm 3\%$ соответственно, затем наблюдался рост, а при концентрации 10^{-4} М и выше - падение амплитуды ответа. Повышение амплитуды при концентрациях 10^{-5} - 10^{-4} М связано, видимо, с анти-ХЭ действием препарата, снижение при высоких концентрациях является результатом преобладания постсинаптического блокирующего эффекта.

В следующей серии экспериментов изучено действие карбоксима на спонтанный сократительный ответ гладкой мышцы трахеи кошки на фоне предварительной обработки аминостигмином.

Поскольку карбоксим наиболее эффективно снимал тонус гладкой мышцы, вызываемый VX, представляло интерес исследовать этот эффект в условиях профилактического применения аминостигмина.

В среднем, через 5 мин аминостигмин в концентрации 10^{-7} М, по нашим оценкам, вызывал 40-50% угнетение активности АХЭ и слабый спонтанный сократительный ответ (5-7%). На этом фоне в раствор добавлялось вещество VX в концентрации 10^{-6} г/мл, достигалось полное угнетение активности АХЭ и максимальное тоническое напряжение

мышцы. Затем избыток ингибиторов удалялся из инкубационной среды и добавлялся карбоксим в возрастающих концентрациях. 50%-ное снижение тонуса наблюдалось при концентрации реактиватора $(1,1 \pm 0,08) \cdot 10^{-5}$ моль/л; В концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л тонический ответ блокировался полностью (рис. 5-B).

Обсуждение результатов

Известно, что добавление *in vitro* ингибиторов АХЭ вызывает развитие стойкого спонтанного сокращения гладких мышц трахеи и бронхов, которое, как полагают, определяется накоплением эндогенного АХ [9, 10]. При этом возрастает на несколько порядков эффективность экзогенного АХ. Так на препарате бронхов крысы концентрация зомана, вызывающая полное угнетение активности ХЭ, увеличивала pD_2 АХ с 3,7 до 6,7 без изменения внутренней активности α . При этом pD_2 и α для КХ не изменялись [9]. В наших экспериментах при полном ингибировании активности ХЭ зоманом или VX реакция мышцы на экзогенный АХ качественно не изменялась, но существенно росла эффективность АХ, что отражалось в снижении EC_{50} АХ более, чем на два порядка. Это связано с тем, что при активном ферменте концентрация АХ у рецепторов существенно ниже той, которая создается во внешнем растворе. По мере угнетения активности АХЭ потери АХ из-за гидролитического расщепления в процессе диффузии снижаются, и эффективность экзогенного АХ возрастает. Можно считать, что при полном угнетении активности ХЭ концентрация АХ у рецепторов соответствует концентрации в экспериментальной камере. Эффективность КХ, негидролизуемого холинэстеразой, не зависела от степени угнетения активности фермента.

По нашим данным [11] спонтанный сократительный ответ гладкой мышцы трахеи кошки при добавлении в инкубационный раствор зомана или VX развивается после 40 процентного угнетения активности АХЭ. При дальнейшем ингибировании ответ нарастает, достигая максимального значения при полной инактивации фермента. Максимальный ответ на аппликацию как зомана, так и VX соответствовал максимальному ответу на экзогенный АХ и полностью подавлялся атропином, что свидетельствует о том, что тонус вызывается накоплением эндогенного АХ и его взаимодействием с М-ХР гладкой мышцы.

Карбоксим в низких концентрациях (менее 10^{-6} М) не вызывал достоверного изменения чувствительности к АХ. При повышении концентрации от 10^{-6} до 10^{-5} М EC_{50} АХ несколько снижалась, затем росла, а при концентрации 10^{-3} М вторично падала. Такое

поведение объясняется, видимо, сочетанием у карбоксима свойств обратимого ингибитора АХЭ, что соответствует биохимическим данным [7], и антагониста М-ХР, поэтому оценка постсинаптического действия карбоксима проводилась с использованием КХ. При концентрациях карбоксима, превышающих 10^{-6} моль/л, чувствительность к КХ начинала снижаться. При концентрации 10^{-3} М EC_{50} КХ падала более чем в 20 раз. Значение K_d реактиватора составляет $(5,0 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$ М. Таким образом, при концентрации карбоксима $5 \cdot 10^{-5}$ М чувствительность М-ХР в интактном препарате падает вдвое.

При исследовании влияния карбоксима на вызванные зоманом спонтанные сократительные ответы установлено, что снижение тонуса наблюдалось лишь в присутствии карбоксима в растворе. При удалении препарата из раствора тонус, как правило, восстанавливался, что свидетельствует о прямом обратимом действии карбоксима на постсинаптическую мембрану мышечного волокна. Описанные эффекты наблюдались как на фоне, так и при удалении избытка зомана из инкубационного раствора. Так как действие карбоксима развивалось на фоне полностью и необратимо инактивированной АХЭ в условиях, исключающих реактивацию, следует полагать, что снятие спонтанного тонуса гладкой мышцы трахеи происходит из-за антагонизма карбоксима с действием АХ на М-ХР. Это подтверждает и достаточно хорошее совпадение IC_{50} с K_d карбоксима (различия недостоверны). Блокирующее действие на М-ХР выявлено также у других оксимов [12, 13].

В опытах с VX карбоксим добавлялся в раствор после удаления избытка VX на фоне полного ингибирования АХЭ. Повышение эффективности спазмолитического действия карбоксима, по сравнению с аналогичными экспериментами с зоманом, несомненно объясняется реактивацией ХЭ.

Карбоксим в концентрациях 10^{-7} и 10^{-6} М вызывал снижение амплитуды фазных сокращений до 60 ± 5 % и $78,5 \pm 3$ % соответственно, затем наблюдался рост, а при концентрации 10^{-4} М и выше - падение амплитуды ответа. Повышение амплитуды при концентрациях 10^{-5} - 10^{-4} М связано, видимо, с антихолинэстеразным действием препарата, снижение при высоких концентрациях является результатом преобладания постсинаптического блокирующего эффекта. Эти данные хорошо совпадают с результатами, полученными в опытах по аппликации экзогенных АХ и КХ. Снижение амплитуды сократительного ответа при низких концентрациях карбоксима указывает на наличие у реактиватора неспецифического пресинаптического действия, которое приводит к уменьшению функционального выброса медиатора.

Предварительное применение аминостигмина вызывало резкое повышение эффективности спазмолитического действия реактиватора. IC_{50} снижалась в 5,6 раза, а концентрация, вызывающая полное расслабление мышцы - в 10 раз. Это указывает на хорошую совместимость реактиватора с обратимым ингибитором АХЭ из группы карбаматов и усиление антидотных свойств карбоксима.

Выводы

1. На изолированном препарате гладкой мышцы трахеи кошки карбоксим в концентрации, превышающей 10^{-6} М проявляет свойства реактиватора и обратимого ингибитора АХЭ.
2. В более высоких концентрациях карбоксим оказывает умеренное М-холинолитическое действие с $K_d 5 \cdot 10^{-6}$ М.
3. Предварительная обработка мышцы обратимым ингибитором АХЭ аминостигмином с последующим введением VX значительно усиливает спазмолитический эффект карбоксима.
4. Сочетание у карбоксима свойств обратимого ингибитора АХЭ и М-холинолитика является важным дополнением к реактивирующему действию, и вносит вклад в его защитную эффективность при отравлении ФОВ.

Литература

1. Глухан Е. Н., Сметанин А. В., Казаков П. В. и др. Вероятностная оценка риска как показатель экологической безопасности на примере объекта по уничтожению химического оружия.. // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). — 2007. — Т. 51, № 2. — С. 52–54.
2. Watson A., Opresko D., Young R. et al. Organophosphate Nerve Agents / In: “Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents”, Ed. by R.C.Gupta. — Oxford: [Elsevier](#), 2009. — P. 43-67.
3. Tetsu Okumura, Kenji Taki, Kouichiro Suzuki, Tetsuo Satoh. The Tokyo Subway Sarin Attack: Toxicological Whole Truth / In: “Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents”, Ed. by R.C.Gupta. — Oxford: [Elsevier](#), 2009. — P. 25-32.
4. Колбасов С. Е., Нечипоренко С. П. Антидотная терапия на догоспитальном этапе оказания медицинской помощи при обеспечении процессов уничтожения химического оружия в Российской федерации / Тезисы Рос. науч. конф. «Проблемы стандартизации

- и внедрения современных диагностических и лечебных технологий в практической токсикологической помощи пострадавшим от острых химических воздействий». — Екатеринбург, 2008. — С. 58.
5. Nechiporenko S. P., Zatsepin E. P. A Study to establish an efficient means for delivering antidotal therapy at nerve agent destruction facilities. // J. Toxicol. Clin. Toxicol. 2003. — Vol. 41, № 5. — P. 723.
 6. Петров А. Н., Софронов Г. А., Нечипоренко С. П. Антидоты фосфорорганических отравляющих веществ. // Рос. хим. ж. (Ж. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). — 2004. — Т. 48, № 2. — С. 110–116.
 7. Прозоровский В. Б., Скопичев В. Г., Панченкова О. А. Оценка реактиватора холинэстеразы карбоксима как средства профилактики отравлений фосфорорганическими ингибиторами холинэстераз. // Психофармакол. биол. наркол. — 2008. — Т. 8, № 3–4. — С. 2457–2462.
 8. Arunlakshana O., Schild H. O. Some quantitative uses of drug antagonists // Br. J. Pharmacol. Chemother. — 1959. — V. 14, № 1. — P. 48–58.
 9. Aas P., Veiteberg T., Fonnum F. In vitro effects of soman on bronchial smooth muscle // Biochem. Pharmacol. — 1986. — V. 35, № 11. — P. 1793–1799.
 10. Aas P., Walday P., Tansø R., Fonnum F. The effect of acetylcholinesterase-inhibition on the tonus of guinea-pig bronchial smooth muscle // Biochem. Pharmacol. — 1988. — V. 37, № 21. — P. 4211–4216.
 11. Sanotsky V. I. The acetylcholine leakage as a cause of toxic effects of organophosphorus cholinesterase inhibitors. // Acta poloniae toxicological. — 1993. — V.1, suppl.1. — P. 12–13.
 12. Loke W. K., Sim M. K., Go M. L. O-Substituted derivatives of pralidoxime: muscarinic properties and protection against soman effects in rats // Eur. J. Pharmacol. — 2002. — V. 442, № 3. — P. 279–287.
 13. Soukup O., Pohanka M., Tobin G. et al. The effect of HI-6 on cholinesterases and on the cholinergic system of the rat bladder // [Neuro Endocrinol. Lett.](#) — 2008. — V.29, №5. — P. 759–762.