

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

**Příprava modulátorů cholinesteras a cholinergních receptorů  
(Preparation of modulators of cholinesterases and cholinergic  
receptors)**

Diplomová práce



Školitelé:

doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

PharmDr. Kamil Musilek, Ph.D.

Hradec Králové, 2011

Jan Röder

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Práce vznikla s podporou grantu SVV-2011-261-001

V Hradci Králové

Jan Röder

Tímto bych chtěl poděkovat svým školitelům doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. a PharmDr. Kamilu Musílkovi, Ph.D. za jejich neustálou a velmi účinnou pomoc a cenné rady při zpracování této práce. Celému týmu laboratoře za skvělou spolupráci a pracovní atmosféru a v neposlední řadě také své rodině a svému nejbližšímu okolí za jejich trpělivost a podporu.

# Abstrakt

**Název:** Příprava modulátorů cholinesteras a cholinergních receptorů

**Autor:** Jan Röder

Organofosforové sloučeniny jsou látky hojně používané jako pesticidy, ale také jako bojové chemické látky. Dnes jsou k profylaktické terapii intoxikací organofosfáty používány látky karbamátového typu. Ty reverzibilně blokují funkci acetylcholinesterasy a tím jí chrání před působením organofosforových látek jako ireverzibilních inhibitorů AChE. Tyto látky však mají mnoho nežádoucích účinků způsobených karbamoylací AChE a proto se hledají nové látky, které by efektivněji splňovaly funkci při profylaktické terapii intoxikací organofosforovými sloučeninami.

V této práci bylo připraveno dvacet modulátorů cholinesteras a cholinergních receptorů. Při testování *in vitro* byly prokázány jejich slibné inhibiční vlastnosti a čtyři z těchto látek byly dále vybrány pro molekulární modelování. V této práci byly zohledněny také předchozí studie vlastností cholinesteras a jejich receptorů. Vlastnosti nově připravených sloučenin byly prodiskutovány. Na základě slibných výsledků *in vitro* testování byly vybrané sloučeniny doporučeny k dalšímu testování *in vivo*, aby se prokázalo či vyvrátilo jejich možné použití v profylaktické léčbě intoxikací organofosforovými sloučeninami.

# Abstract

**Title:** Preparation of modulators of cholinesterases and cholinergic receptors

**Author:** Jan Röder

Organophosphorus compounds are widely used as pesticides and were also misused as chemical warfare agents. Up to date, the pre-exposure treatment of organophosphorus compounds intoxication consists in use of carbamate cholinesterase inhibitors. Carbamates act as reversible inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) and thus protect it against irreversible inhibition with organophosphorus compounds. However, carbamates showed severe undesirable effects caused by carbamylation of AChE, and therefore there is trend to find novel compounds, which could more effectively act as protection against intoxication with organophosphorus compounds.

Twenty modulators of cholinesterases and cholinergic receptors were prepared in this project. These compounds showed promising inhibition ability during *in vitro* testing and four of them were chosen for further molecular modelling studies. The former studies of AChE and its receptors features were also taken into account. The properties of newly prepared compounds were discussed. Based on promising results after *in vitro* evaluation, several compounds were recommended for further *in vivo* studies in order to prove or disprove their effectiveness in pre-exposure treatment with organophosphorus compound intoxication.

# Obsah

1. SEZNAM ZKRATEK .....	8
2. ÚVOD .....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	10
3.1. ACETYLCHOLIN .....	10
3.1.1. Nikotinové receptory (nAChR) .....	11
3.1.2. Muskarinové receptory (mAChR) .....	12
3.2. CHOLINESTERASY .....	14
3.3. ACETYLCHOLINESTERASA .....	15
3.3.1. Struktura acetylcholinesterasy .....	15
3.3.2. Hydrolýza acetylcholinu .....	16
3.4. BUTYRYLCHOLINESTERASA .....	18
3.5. INHIBICE ACETYLCHOLINESTERASY .....	19
3.6. REVERZIBILNÍ INHIBITORY ACETYLCHOLINESTERASY .....	20
3.6.1. Využití reverzibilních inhibitorů acetylcholinesterasy .....	21
3.7. ORGANOFOFOROVÉ SLOUČENINY .....	22
3.7.1. Mechanismus účinku organofosforových látek .....	23
3.7.2. Biotransformace organofosforových látek .....	24
3.8. NERVOVĚ PARALYTICKÉ LÁTKY .....	26
3.8.1. Rozdělení nervově paralytických látek .....	26
3.9. KLINICKÝ OBRAZ INTOXIKACE ORGANOFOFOROVÝMI LÁTKAMI .....	29
3.9.1. Akutní fáze .....	29
3.9.2. Přejídný syndrom .....	30
3.9.3. Opožděná polyneuropatie .....	30
3.10. DIAGNOSTIKA INTOXIKACÍ ORGANOFOFOROVÝMI LÁTKAMI .....	32
3.11. FARMAKOLOGICKÁ PROFYLAXE INTOXIKACE ORGANOFOFOROVÝMI LÁTKAMI .....	33
3.11.1. Proteiny-scavengery .....	33
3.11.2. Reversibilní inhibitory .....	34
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	36

4.1.	SYNTETICKÁ ČÁST.....	36
4.1.1.	Obecná syntetická část.....	36
4.1.2.	Příprava biskvarterních solí.....	37
4.2.	STANOVENÍ INHIBIČNÍCH PARAMETRŮ ELLMANOVOU METODOU <i>IN VITRO</i> .....	58
4.2.1.	Princip metody .....	58
4.2.2.	Postup měření inhibiční aktivity.....	59
4.2.3.	Postup měření kinetiky enzymu .....	60
4.2.4.	Postup molekulárního modelování .....	61
4.2.5.	Výsledky měření.....	62
5.	DISKUSE.....	65
6.	ZÁVĚR.....	69
7.	POUŽITÁ LITERATURA.....	70

# 1. SEZNAM ZKRATEK

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
Asp	asparagová kyselina
BuChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervový systém
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzenová kyselina
FyzR	fyzilogický roztok
GIT	gastrointestinální trakt
Glu	glutamin
His	histidin
IACHe	inhibitor acetylcholinesterasy
M	muskarinový receptor
mAChR	muskarinový receptor pro acetylcholin
MeCN	acetonitril
nAChR	nikotinový receptor pro acetylcholin
NPL	nervově paralytické látky
OP	organofosforové sloučeniny
PAS	peripheral anionic site (periferní anionické místo)
Phe	fenylalanin
Ser	serin
SLK	střední letální koncentrace
TcAChE	Acetylcholinesteráza druhu <i>Torpedo californica</i>
TNB <sup>-</sup>	5-sulfanyl-2-nitrobenzoový anion
Trp	tryptofan

## 2. ÚVOD

Organofosforové sloučeniny byly poprvé syntetizovány v devatenáctém století. Nejprve byly zkoumány pro svůj pesticidní účinek, avšak pro svou cholinergní aktivitu z nich později byly vyvinuty bojové chemické látky, takzvané nervově paralytické látky (tabun, sarin, soman). Mechanismem organofosforových sloučenin (OP) je ireverzibilní inhibice enzymu acetylcholinesterasy (AChE). Takto inhibovaná AChE ztrácí svou biologickou funkci a dochází k hromadění jejího substrátu acetylcholinu na nervosvalové ploténce. Právě hrozba použití OP pro vojenské účely vedla k vývoji sloučenin, které by sloužily jako efektivní terapie při zásahu nervově paralytickými látkami. Zkoumány jsou sloučeniny s reaktivačními schopnostmi vůči inhibované AChE. Jako profylaxe intoxikací OP jsou používány inhibitory AChE (např. pyridostigmin-bromid). Účinkují blokadou AChE a tím ji chrání proti ireverzibilní inhibici OP. Nicméně aktuálně používané inhibitory AChE mají celou řadu nežádoucích vedlejších účinků. Cílem této práce je příprava nové skupiny sloučenin s různými spojovacími řetězci mezi dvěma *terc*-butyl pyridiniovými jádry, které by vykazovaly efektivnější profylaktické vlastnosti při intoxikaci OP, popř. mohly být použity jako účinnější léčiva např. u myastenia gravis.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1. ACETYLCHOLIN

Acetylcholin (ACh) je běžným neurotransmiterem v centrálním i periferním nervovém systému. Je fyziologicky využíván jako hlavní neurotransmitter v parasympatických postangliových vláknech, ale účastní se přenosu nervového vzruchu i ve vegetativních gangliích a na zakončení somatických motorických vláken inervujících příčně pruhované svaly, tedy na nervosvalové ploténce. Acetylcholinem je také zprostředkováno uvolňování adrenalinu z dřeně nadledvin (1).

Acetylcholin je syntetizován v cytoplazmě neuronů z acetyl-koenzymu A a cholinu účinkem enzymu cholinacetyltransferasy. Takto syntetizovaný ACh je pak skladován v cytoplazmě neuronů v zásobních vezikulech, z kterých je uvolňován do synaptické štěrbině na popud vstupu iontů kalcia do cytoplazmy nervového zakončení (1).

Cholin je přijímán na místo syntézy z plazmy, ale také zpětně ze synaptické štěrbině, kde vzniká rozložením ACh již použitého na stimulaci receptorů (1).

Po uvolnění do synaptické štěrbině se ACh váže na acetylcholinové receptory na postsynaptické membráně. Mimo receptorů postsynaptických také částečně interaguje s receptory presynaptickými, čímž reguluje množství uvolňovaného neurotransmiteru.

Jeho účinek je ukončen rychlou hydrolýzou (do 1 ms) enzymem AChE a tímto je ukončen i přenos nervového impulzu.

Rozeznáváme dva typy cholinergních receptorů: nikotinové a muskarinové. Tyto receptory byly takto označeny díky schopnosti přírodních alkaloidů nikotinu a muskarinu interagovat s těmito receptory a takto napodobovat

účinek ACh. Tyto receptory se dále dělí na dva podtypy u nikotinových a pět podtypů muskarinových (1).

### 3.1.1. Nikotinové receptory (nAChR)

nAChR hrají hlavní úlohu při mezibuněčné komunikaci v mozku a na nervosvalovém spojení. Účastní se kognitivních funkcí CNS, jako je stav vědomí, pozornost, učení a paměť (2).

nAChR jsou receptory prototypu iontového kanálu, jehož aktivita je závislá na navázání ligandu. Skládají se z pěti homogenních podjednotek pentamerní struktury (3).

V organismu byly pomocí selektivních agonistů i jiných metod identifikovány dva typy nAChR:

1. Muskulární nAChR zprostředkovávají přenos signálu mezi buňkami nervu a svalů a jsou lokalizovány především na neuromuskulárních spojeních. Jedná se o ligandem řízené iontové kanály složené z pěti podjednotek, dvě podjednotky  $\alpha_1$ , a dále podjednotky  $\beta_1$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  popř.  $\epsilon$ . Tyto podjednotky jsou uspořádány do pentamerní struktury obklopující transmembránový pór.
2. Neuronální nAChR se nacházejí v CNS a na postsynaptické membráně ve vegetativních gangliích, kde zprostředkovávají přenos signálu mezi neurony. Jedná se také o ligandem řízené iontové kanály, ale skládají se z podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$  různého druhu a farmakologických vlastností. Účastní se fyziologických projevů ACh a jsou spojeny s různými neurotransmitterovými systémy (1,3).

Expresce těchto receptorů je odvislá od stádia vývoje a stárí, ale také se mění v průběhu různých nemocí, jako jsou Alzheimerova choroba, parkinsonismus či schizofrenie (4).

Molekuly ACh se váží na dvě podjednotky  $\alpha$  receptoru (pouze na podjednotce  $\alpha$  se nachází vazebné místo pro ACh), čímž způsobí změnu prostorového uspořádání. Tato změna způsobí otevření iontového kanálu pro  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.1.2. Muskarinové receptory (mAChR)

mAChR se nachází na postsynaptické membráně efektorových buněk parasymptiku a jejich stimulace vede k širokému spektru účinku. Na periférii zprostředkovávají např. řízení činnosti srdce, hladkých svalů, exokrinních žláz, v CNS jsou zahrnuty do regulace teploty, procesu učení a paměti (1, 5).

Muskarinové receptory patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem. Strukturně jsou to glykoproteiny se sedmi transmembránovými doménami. (6) Pomocí klonování a dalších metod bylo zjištěno 5 subtypů mAChR ( $M_1$  –  $M_5$ ) s různou lokalizací a specifitou pro různé tkáně. Funkční význam těchto subtypů byl nejlépe definován pro  $M_1$ ,  $M_2$  a  $M_3$ .

$M_1$  podtyp se nachází především v CNS, na periferních neuronech a parietálních buňkách žaludku. Zprostředkovávají především excitační účinky acetylcholinu, což má za následek pomalou stimulaci v CNS a zvýšení sekrece kyseliny chlorovodíkové.

$M_2$  podtyp se vyskytuje převážně na srdeční svalovině, ale i v neuronálních tkáních. Jejich účinek je převážně inhibiční, snižuje srdeční činnost a způsobuje presynaptickou inhibici v centrálním i periferním nervovém systému.

$M_3$  podtyp se vyskytuje především v hladkých svalech a exokrinních žlázách. Jsou odpovědné za excitační účinky acetylcholinu a cholinergní stimulaci, což způsobuje zvýšení svalového tonu a zvýšení sekrece žláz. Zajímavostí je, že v hladké svalovině cév způsobují naopak její relaxaci, což vede k vazodilataci.

Funkční význam receptorů  $M_4$  a  $M_5$  zatím nebyl dostatečně definován, ví se pouze, že typ  $M_4$  vykazuje jistou podobnost s  $M_2$  a je lokalizován v žlázách a CNS. Receptor  $M_5$  je podobný  $M_1$  a jeho lokalizace není přesně známa (1).

## 3.2. CHOLINESTERASY

Cholinesterasy patří do velké skupiny proteinů sdílejících  $\alpha/\beta$  hydrolasovou řasu. Tato velká rodina enzymů zahrnuje také např. lipasy, peptidasy, dehalogenasy aj. Dřívější studie prokázaly, že se cholinesterasy (ChEs) od sebe liší svou substrátovou specifitou, tkáňovým výskytem a biologickou funkcí, ale také afinitou k různým inhibitorům. Enzymy této skupiny jsou charakteristické svou zvýšenou afinitou k esterům cholinu a hydrolyzují je podstatně rychleji než ostatní esterasy za optimálních podmínek, ale působí také na různé druhy karboxylových esterů (7).

Enzym, který má zvýšenou afinitu k malým substrátům a přednostně hydrolyzuje estery octové kyseliny, jako acetylcholin, se nazývá acetylcholinesterasa nebo také acetylcholin hydrolasa (EC 3.1.1.7). Nachází se v nervovém systému, mozku a také, podle novějších poznatků, na membráně červených krvinek. Enzym, který hydrolyzuje i větší substráty a jeho specifita není natolik vysoká, tudíž hydrolyzuje mimo acetylcholin i butyrylcholin a jiné substráty, se nazývá butyrylcholinesterasa, acylcholin hydrolasa (BuChE, EC 3.1.1.8), ale je znám také jako pseudocholesterasa či nspecifická cholinesterasa. Tento enzym se nachází v plazmě, játrech, cerebrospinálním moku a gliových buňkách. Nicméně AChE a BuChE jsou si natolik strukturně blízké, že je nemyslitelné popisovat jednu bez odkazování se na druhou (10).

### 3.3. ACETYLCHOLINESTERASA

AChE, která se nachází u savců, ale také u ostatních druhů jako např. v bakteriích a některých rostlinách, je enzymem, který hraje významnou úlohu v cholinergním přenosu. Štěpí neuromediátor acetylcholin na periferních a centrálních cholinergních synapsích v nervovém systému. AChE se vyskytuje v nadbytku v různých tkáních a orgánech, a v těchto strukturách má také různou aktivitu. Například v mozku je její aktivita mnohonásobně vyšší, než je nutné pro mozkovou fyziologickou funkci (8).

#### 3.3.1. Struktura acetylcholinesterasy

Aktivní místo AChE se skládá ze dvou podjednotek: záporně nabitě, tzv. anionické podjednotky, kde se váže kladně nabitý kvartérní dusík molekuly substrátu a je odpovědná za správnou orientaci molekuly substrátu k druhé podjednotce, tzv. acylační (esteratické) podjednotce. Tato podjednotka obsahuje vlastní katalytické zbytky, pravděpodobně nukleofilního i elektrofilního charakteru a zastává vlastní katalytickou úlohu. Dále byla na základě vaznosti biskvartérních molekul definována druhá anionická podjednotka, tzv. periferní anionická jednotka, neboli „peripheral anionic site“ (PAS), vzdálená 14Å od aktivního místa (9).

Předpokládá se, že jako nukleofilní složka AChE slouží serinový zbytek spolu s histidinovým, který zvyšuje jeho nukleofilní vlastnosti. V minulosti se rovněž mělo za to, že za hydrolýzu v aktivním místě u AChE je odpovědná triáda Asp-His-Ser, a tak byla AChE klasifikována jako serinová hydrolasa. Díky vysoké katalytické efektivitě cholinesteras se předpokládala lokalizace tzv. katalytické triády na povrchu proteinu enzymu (10).

Velký krok vpřed v pochopení struktury, katalytického mechanismu AChE a mechanismu účinku inhibitorů byl učiněn v roce 1991 a to díky stanovení

trojrozměrné struktury dimerní AChE z *Torpedo californica* (TcAChE) skupinou Joela Sussmana (11).

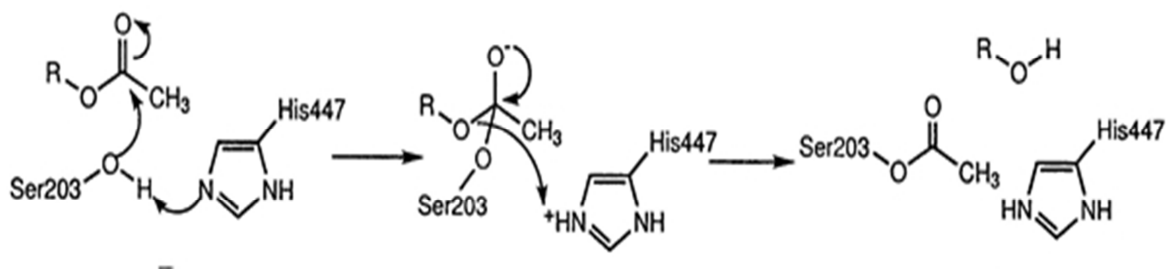
Tato studie odhalila, že katalytická triáda obsahuje glutamát (Glu), namísto předpokládaného aspartátu (Asp). Aktivní místo enzymu bylo objeveno na dně úzké štěrbiny nacházející se 20 Å od povrchu a tato štěrbina je lemována 14 aromatickými zbytky AK, které se zdají hrát důležitou roli ve vedení substrátu k aktivnímu místu enzymu (10).

Podle posledních studií byla zpochybněna úloha anionické podjednotky jako vazebného místa pro část molekuly substrátu nesoucí kladný náboj. Bylo dokázáno, že v případě cholinu se trimethylamoniová skupina váže interakcí s  $\pi$  elektrony Trp84. Proto bylo toto místo přehodnoceno jako kation- $\pi$  interaktivní podjednotka. Navíc při pokusech s inhibicí AChE navázáním inhibitorů jako např. dekamethonia či edrofonie se tyto inhibitory vázaly v aktivním místě také pomocí interakce s  $\pi$  elektrony, ale v tomto případě Trp279 (9).

Studie myší, ale později i lidské AChE, našly shodu s TcAChE a tuto hypotézu potvrdily (10).

### 3.3.2. Hydrolýza acetylcholinu

Důležitou hlavní vlastností AChE je rychlá hydrolýza neurotransmiteru ACh na cholinergních synapsích. Hydrolýza začíná nukleofilním atakem hydroxylové skupiny serinu v aktivním místě AChE na karbonylový uhlík. Následuje tvorba dočasné kovalentní vazby mezi substrátem a enzymem. Dále nukleofilní reakci může také podporovat vodíková vazba tvořená mezi imidazolovým dusíkem histidinu a hydroxylovou skupinou serinu (12). Následuje uvolnění cholinu, přičemž enzym zůstává po velice krátkou dobu acetylován. Tento děj je ukončen rychlou hydrolýzou acetylovaného enzymu a znovuobnovením esteratického místa (Schéma 1) (9).



**Schéma 1** Acylace acetylcholinesterasy (13)

Charakteristickou vlastností AChE je její inhibice v přítomnosti vysoké koncentrace substrátu. Tato skutečnost je připisována PAS. Předpokládá se, že PAS plní funkci regulátoru vaznosti v aktivním místě, tedy jakéhosi stabilizátoru enzymu. Při vysoké koncentraci substrátu, jeho molekula interaguje s PAS a působí jistou konformační změnu enzymu a tím ovlivňuje jeho katalytickou aktivitu (10). Jedna z teorií hovoří také o tom, že tato konformační změna zamezuje vstup vody do aktivního místa a tím zamezuje jeho deacetylaci (14). Je nutno podotknout, že žádná z těchto teorií nebyla plně prokázána, a tak zůstává mechanismus substrátové inhibice AChE zatím nedořešen.

### 3.4. BUTYRYLCHOLINESTERASA

Plazmatická cholinesterasa, označovaná také jako BuChE, je glykoprotein tvořený v játrech a cirkulující v plazmě. BuChE je serinová hydrolasa, která patří do rodiny esteras katalyzující hydrolyzu esterů jako je cholin. Struktura BuChE vykazuje 64% podobnost s AChE v sekvenci aminokyselin (15).

BuChE je schopna hydrolyzovat stejné substráty jako AChE a v některých případech je schopna nahradit funkci AChE. Ve světle těchto faktů víme, že některé inhibitory AChE inhibují rovněž BuChE a ta hraje roli ve vylučování molekul nervově paralytických látek a pesticidů z krevního oběhu (16). Charakteristickou vlastností BuChE je také její aktivace při nadbytku substrátu na rozdíl od AChE (17).

Rozdíly v katalytické aktivitě, afinitě a schopnosti hydrolyzovat určité substráty je oproti AChE dána u BuChE rozdíly ve struktuře obou enzymů. Afinita AChE k méně objemným substrátům je zapříčiněna menším rozměrem aktivního místa (vazebné úžlabiny), kdežto u BuChE je toto místo větší, a proto BuChE hydrolyzuje i objemnější substráty a její substrátová specifita je širší. Rozdíly v katalytické aktivitě obou enzymů, mimo rozměrů aktivního místa, zapříčiňují také rozdíly ve struktuře v okolí aktivního místa. Zatímco u AChE jsou aromatické zbytky nesubstituované, u BuChE, 6 ze 14 těchto zbytků jsou substituovány menšími aromatickými, nebo dokonce polárními substituenty (10).

V porovnání s AChE nebyla fyziologická funkce BuChE zatím zjištěna, nicméně se předpokládá její podíl na procesech cholinergní transmise, neurodegenerativních poruch a jiných systémových funkcí jako např. proliferace buněk a růst axonů při vývoji nervové soustavy (18-19).

### 3.5. INHIBICE ACETYLCHOLINESTERASY

Inhibice AChE je děj významný z terapeutického i toxikologického hlediska. Inhibitory tohoto enzymu působí jako nepřímá parasymptomimetika. Blokádou tohoto enzymu a znemožnění jeho fyziologického účinku na ACh, zvyšují koncentraci ACh v systémech, kde je neuromediátorem, tj. na efektoech parasymptiku, vegetativních gangliích a na nervosvalovém spojení. Je třeba poznamenat, že inhibitory ACh (IACH) svou aktivitou ve svém důsledku vykazují cholinomimetické účinky (1).

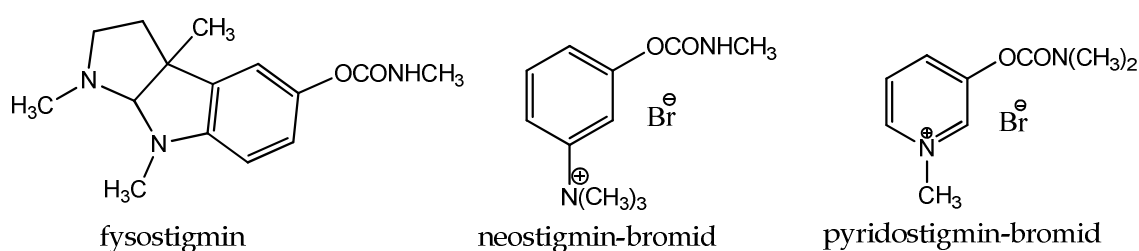
Různé IACH se liší svou chemickou strukturou a svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Mohou se dělit do skupin podle místa svého účinku na základě těchto vlastností. Tedy látky s terciálním dusíkem mají schopnost pronikat přes hematoencefalickou bariéru do CNS a působit centrálně. Naproti tomu látky mající ve své struktuře dusík kvartérní, tzn. mají kladný náboj, tuto schopnost postrádají a vykazují periferní účinky.

Důležitějším kritériem klasifikace IACH je délka jejich působení na AChE, tedy doby, po kterou trvá hydrolýza a deacylace enzymu. Determinantou délky účinku IACH je jejich chemická struktura a schopnost tvořit interakce/vazby s AChE. Podle účinku se dělí do dvou základních skupin:

- Reverzibilní inhibitory AChE – hydrolýza trvá v závislosti na struktuře inhibitoru 0,5 – 6 hodin
- Ireversibilní inhibitory AChE – organofosforové sloučeniny, hydrolýza trvá až stovky hodin (5)

### 3.6. REVERZIBILNÍ INHIBITORY ACETYLCHOLINESTERASY

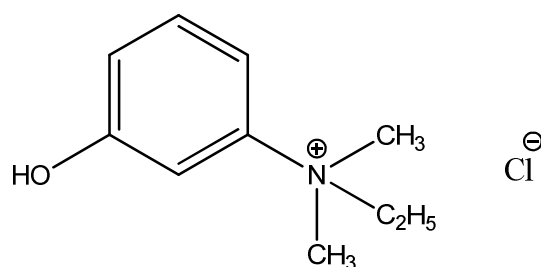
Jsou to sloučeniny svou strukturou podobné ACh. Vážou se na aktivní místo enzymu kovalentní vazbou, a tím zamezí přístupu ACh k tomuto místu. Chemicky se jedná o karbamáty, tedy estery kyseliny methylkarbamové nebo dimethylkarbamové s bazicky substituovaným fenolem. Tyto látky obsahují terciální nebo kvartérní dusík (Obr. 1) (1, 20).



**Obrázek 1** Vybrané reverzibilní inhibitory acetylcholinesterasy.

Mechanismus reakce reverzibilních IChE je podobný ACh, taktéž podstupují dvoustupňovou hydrolyzu. Kyselá skupina esteru těchto inhibitorů se váže na enzym stejně jak je tomu v případě ACh, nicméně jsou vázány pevnější vazbou. Spontánní hydrolyza této vazby na volný enzym pak trvá 0,5 - 6 hodin v závislosti na použitém karbamátovém derivátu (5).

Výjimku mezi touto skupinou IChE tvoří látka edrofonium-chlorid (Obr. 2). Ve své struktuře sice obsahuje kvartérní dusík, ale postrádá karbamátovou skupinu, tudíž se váže na enzym pouze pomocí kation- $\pi$  interakce. Tato interakce je v porovnání s kovalentní vazbou v předchozím případě o mnoho slabší, a tak je inhibiční účinek edrofonie velmi krátký, cca. 2 -10 min (7).



edrofonium-chlorid

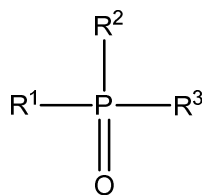
**Obrázek 2** edrofonium-chlorid

### 3.6.1. Využití reverzibilních inhibitorů acetylcholinesterasy

Jak již bylo zmíněno, IChE mají cholinomimetický účinek, čehož se využívá v terapii různých chorob nebo také v diagnostice. Ve správně zvolených terapeutických dávkách zesilují působení ACh na nervosvalovém spojení a projevují se také M-účinky v GIT, urogenitálním systému, ale i v oku a CNS. Reverzibilní IChE se používají v terapii různých onemocnění, jako je autoimunitní onemocnění myastenia gravis, v symptomatické terapii Alzheimerovy choroby, glaukomu oka a v neposlední řadě atoniích GIT a urogenitálního traktu. Díky jejich účinku se využívají také jako antidota myorelaxancií působících na periférii (1). Velmi důležitou úlohu hrají při farmakologické profylaxi proti intoxikaci organofosforovými sloučeninami/nervově paralytickými látkami (21).

### 3.7. ORGANOFOFOROVÉ SLOUČENINY

Mezi ireverzibilní inhibitory ACh se řadí některé organické sloučeniny, které obsahují ve své molekule fosfor substituovaný různými substituenty (Obr. 3). Organofosforové sloučeniny (OP) jsou kapaliny s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a různí se také ve své toxicitě. Tato skupina obsahuje jak prakticky netoxické sloučeniny (malathion), tak i sloučeniny s vysokou toxicitou (21). Expozice organismu již malým dávkám OP může být smrtelná (19). Časté případy otrav OP jsou u pracovníků v zemědělství, kteří jsou přímo ve styku s těmito sloučeninami (22). Podle Světové zdravotnické organizace se ve světovém měřítku každý rok stane více než milion náhodných a dva miliony sebevražedných případů otrav OP. Z těchto případů je kolem 200 000 smrtelných, většinou v rozvojových zemích (23).



Obrázek 3 Obecná struktura OP.

Nejdůležitější skupinou mající signifikantní biologický efekt je skupina této obecné struktury, kde R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup> jsou alkyl-, alkoxy-, alkylsulfanyl- nebo amidové skupiny. R<sup>3</sup> mohou být např. halogen-, kyano-, S-R nebo, O-R skupiny (21).

OP byly původně vyvinuty a i dnes se hlavně využívají jako látky hubící hmyz, tedy insekticidy. Sloučeniny těchto struktur jsou také pro své vlastnosti využívány v průmyslu, a to jako změkčovadla či hydraulické kapaliny, ale také ve veterinární a humánní medicíně jako léčiva nebo sloučeniny pro výzkum nervových funkcí. Některé OP byly díky své toxicitě zneužívány jako významná a nebezpečná skupina bojových chemických látek, známých také jako nervově paralytické látky (NPL) (24).

### 3.7.1. Mechanismus účinku organofosforových látek

OP se dostávají do těla velmi snadno díky své vysoké lipofilitě. Na místo účinku jsou transportovány pomocí krevního řečiště. Po vstupu do organismu se ale vážou i na jiné bílkoviny jako je BuChE, karboxylesterasy a fosforylfosfatasy v plazmě, čímž dochází ke značným ztrátám. Předpokládá se, že na místo účinku se dostane pouze 1 - 3 % z celkového množství OP, které vstoupí do organismu. Interakce s těmito enzymy nevyvolává žádné klinické příznaky intoxikace, takže tyto esterasy vlastně fungují jako tzv. „scavengery“ (vyčytávači) OP. Tohoto jevu využívají nové přístupy k profylaktické terapii a terapii akutní intoxikace OP (26).

Reaktivita OP závisí na jejich chemické struktuře. Pro biologický účinek OP je významná elektrofilita atomu fosforu. OP nesoucí dvojnou vazbu mezi atomem fosforu a kyslíku mají atom fosforu vysoce elektrofilní, a tudíž jsou i vysoce reaktivní. Kyano-, halogen-, karbonyl- a esterový substituent jsou funkční skupiny, které reaktivitu ještě více podporují. Naopak skupiny reaktivitu oslabující jsou hydroxylová a karboxylová skupina (25).

Mechanismus účinku OP se zakládá na inhibici serinových esterás, tedy hlavně AChE a BuChE (schéma 2). OP jsou elektrofilní molekuly se schopností fosforylovat nebo fosfonylovat hydroxylovou skupinu serinu nacházející se v aktivním místě AChE. Dochází k vytvoření kovalentní vazby mezi enzymem a OP za odštěpení části molekuly OP (odstupující je skupina R<sup>3</sup> obecné struktury OP, Obr. 4). Takto inhibovaná AChE je obecně velmi stabilní a regeneruje se spontánní hydrolýzou esteru jen velmi pomalu. Ve svém důsledku tato hydrolýza trvá déle než syntéza enzymu *de novo*, proto tuto inhibici považujeme za ireverzibilní (27).

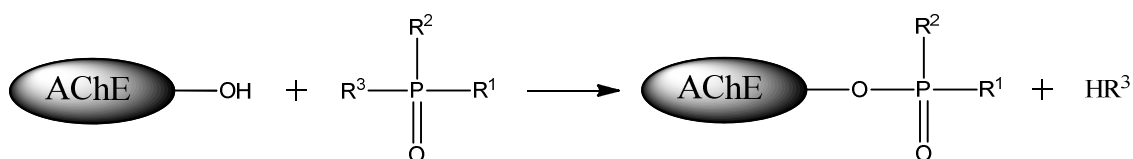


Schéma 2 Inhibice acetylcholinesterasy.

### 3.7.2. Biotransformace organofosforových látek

Fáze I metabolické transformace OP se skládá ze šesti hlavních reakcí, z nichž většina slouží jako cesty aktivace, což činí produkty této transformace toxickejší:

- oxidativní desulfurace – přeměna thiofosfátu na toxickejší oxonovou formu (např. parathion, fenitrothion, malathion, dimethoát, fonofos a další)
- oxidativní *N*-dealkylace (např. monokrotofos, dikrotofos, fosfamidon, dimethoát)
- oxidativní *O*-dealkylace (např. chlorfenvinfos)
- thioetherová oxidace (např. fenthion, disulfoton, demethon-*S*-methyl a další)
- oxidace postranního řetězce (např. diazinon, fenitrothion)
- různé neoxidativní transformace (např. trichlorfon, naled)

V druhé fázi, tzv. detoxifikační fázi, OP podstupují konjugaci s endogenními substráty, jako jsou glukuronidy a sulfáty. Detoxikovány jsou pomocí:

- karboxylesteras (malathion, soman, sarin, tabun)
- fosforylfosfatas (diazinon, paraoxon, soman, sarin, tabun)
- redoxního systému glutationu (fenitrothion, diazinon, chlorfenvinfos, atd.) (5)

OP jsou aktivovány systémem cytochromu P450, tedy NADPH-cytochromu P450 reduktasy a monooxygenasy obsahující flavin.

Nejběžnější cesta metabolismu OP je skrze hydrolýzu, která vede k odštěpení části molekuly. Tento produkt je pak vylučován močí a slouží jako biomarker expozici OP/NPL. Tyto části obsahují dimethylfosfát, dimethylthiofosfonát, dimethyldithiofosfát, dimethylfosfothionát, diethylfosfát, diethylfosfonát, diethyldithiofosfát a diethylfosforthionát. Fosforylfosfatas, enzymy odpovědné za hydrolýzu a deaktivaci OP, jsou přítomny v mnoha tkáních, nicméně nejaktivnější jsou především v játrech, ve střevě a plasmě. Jednotlivé

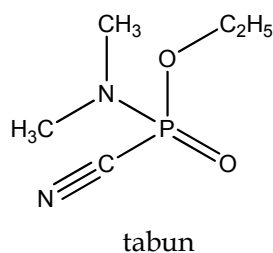
OP mají různé odstupující skupiny (odštěpené části molekul hydrolýzou) a míra jejich hydrolýzy se liší látka od látky i přes podobnost jejich konečných metabolitů v moči (25).

## 3.8. NERVOVĚ PARALYTICKÉ LÁTKY

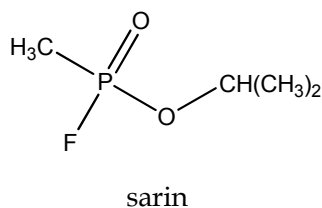
NPL jsou charakteristické svou vysokou toxicitou vůči savcům, rychlým nástupem účinku a vstupem do organismu všemi branami. Jejich levná a snadná výroba a jednoduchá použitelnost z nich dělá vojensky snadno použitelné látky, a také představuje vysoké riziko jejich zneužití při teroristických útocích, jako tomu bylo během teroristického útoku v městě Matsumoto v Japonsku v roce 1994 a tokijském metru o rok později sektou Óm šinrikjó (24,25). NPL se podle svých fyzikálně-chemických vlastností dělí na dvě velké skupiny, G-látky a V-látky.

### 3.8.1. Rozdělení nervově paralytických látek

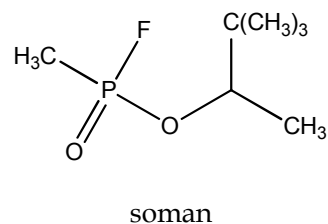
- G-látky, jsou bezbarvé, pohyblivé kapaliny podobné vodě. Relativně dobře se rozpouští ve vodě a jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Jsou bez zápachu a vysoce těkavé, takže nejpravděpodobnější cesta vstupu do organismu je skrze dýchací cesty. V prostředí vydrží 12 – 24 hodin bez ztráty toxicity. Jejich toxicita, která je obecně vysoká, je relativní v závislosti na cestě vstupu do organismu. Střední letální koncentrace (SLK) v ovzduší se je 0,003 – 0,008 mg/l. SLK při zamoření nechráněné kůže je 0,7 – 7 mg/kg. Tyto koncentrace vedou po 1minutové expozici ke smrti poloviny zasažených. (24) Mezi zástupce G-látek patří tabun (Obr. 4.1), sarin (Obr. 4.2), soman (Obr. 4.3) a cyklosin (Obr. 4.4).



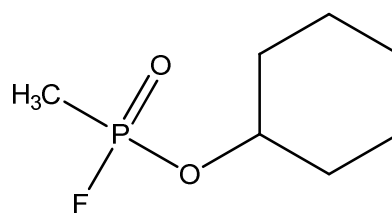
Obrázek 4.1 tabun



Obrázek 4.2 sarin



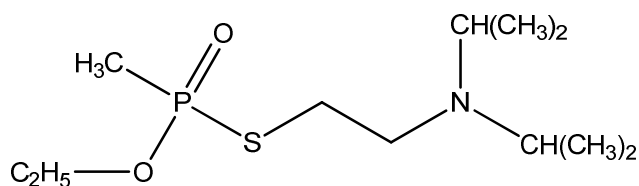
Obrázek 4.3 soman



cyklosin

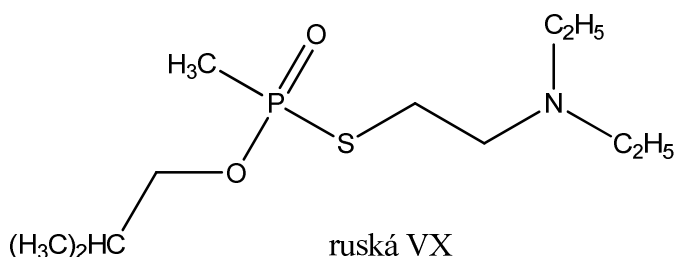
**Obrázek 4.4** cyklosin

- V-látky, jsou bezbarvé, vazké kapaliny. Špatně se rozpouští ve vodě a jsou velice dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Jsou bez zápachu. Jsou charakteristické velmi nízkou těkavostí, takže v prostředí vydrží velmi dlouhou dobu, týdny až měsíce. Při intoxikaci přes kůži jsou daleko toxičtější než G-látky. Jejich SLK v ovzduší je 0,036 mg/l a při zamoření nechráněné kůže 0,07 mg/kg. Mezi zástupce V-látek patří VX (Obr. 5.1), ruská VX (Obr. 5.2) a čínská VX (Obr. 5.3) (24).



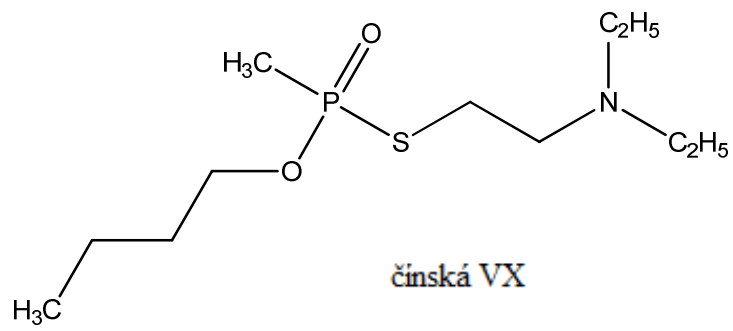
VX

**Obrázek 5.1** VX



ruská VX

**Obrázek 5.2** ruská VX



Obrázek 5.3 čínská VX

### **3.9. KLINICKÝ OBRAZ INTOXIKACE ORGANOFOSFOROVÝMI LÁTKAMI**

Po navázání OP na serinový hydroxyl aktivního místa je AChE blokována a ztrácí svou enzymatickou aktivitu. To vede k hromadění ACh v synaptických štěrbinách svalů a nervů, čímž dochází k nadměrné stimulaci cholinergních receptorů vedoucí až k cholinergní krizi. OP mají navíc i přímý vliv na cholinergní receptory a způsobují jejich poškození (28).

Nadměrné a dlouhodobé dráždění receptorů se podle lokalizace klinicky manifestuje muskarinovými, nikotinovými a centrálními účinky akutní cholinergní krize. Celkový průběh intoxikace pak rozdělujeme na tři fáze.

#### **3.9.1. Akutní fáze**

Muskarinové příznaky v akutní fázi se projevují zúžením zornic (mióza), na ciliárním svalu poruchou akomodace oka, překrvením a otokem na spojivkách a nosní sliznici, zvýšenou činností slinných, slzných a potních žláz, na hladké svalovině dýchacích cest zvýšením bronchiální sekrece a zúžením bronchů. Dále na hladké svalovině GIT a močového měchýře zvýšenou střevní peristaltikou a bolestmi až kolikovitého rázu. Muskarinové příznaky se projeví také na srdeční svalovině zvýšeným tonem, což vede k bradykardii a poklesu krevního tlaku.

Nikotinové příznaky jsou charakterizovány svalovou ochablostí, třesem a záškuby příčně pruhovaných svalů postupně se rozšiřujícími na celé tělo. Tyto fascikulace postupně přecházejí v tonicko-klonické křeče vedoucí až k celkové paralýze kosterního svalstva. Právě paralýza dýchacího svalstva je hlavní příčinou úmrtí v důsledku otravy OP/NPL.

Centrální příznaky se manifestují depresi dechových a kardiovaskulárních center v oblasti prodloužené míchy. Doprovází je bolesti hlavy a emoční nestabilita, neklid, napětí, zmatenost a depresivní stavy (24,29).

### **3.9.2. Přechodný syndrom**

Přechodný syndrom se objevuje 1. až 4. den po intoxikaci OP/NPL. Manifestuje se svalovou slabostí a obrnou hlavových nervů. Tato fáze může vyústit až v respirační selhání způsobené obrnou dýchacích svalů. Předpokládá se, že přechodný syndrom je způsoben pozměněnou funkcí nikotinových receptorů, nicméně přesná patogeneze tohoto syndromu zůstává zatím neobjasněná (30).

### **3.9.3. Opožděná polyneuropatie**

Opožděná polyneuropatie se dostavuje v 7. – 21. den po intoxikaci OP/NL. Postihuje nervy periferního nervového systému, s příznaky slabostí svalů horních a dolních končetin a poruchou jejich senzoryckých funkcí. Tato polyneuropatie je způsobená histologickými změnami v periferních neuronech, což má za následek demyelinizaci nervů a degeneraci axonů. Manifestuje se bolestí a parestezií končetin. Denervace svalů končetin může v některých případech vést až k jejich těžké atrofii. Předpokládá se, že opožděná polyneuropatie je způsobená fosforylací a následnou dealkylací tzv. neurotoxické esterasey, která je přirozenou součástí nervové tkáně (31-32).

Navíc může být klinický stav intoxikovaného jedince komplikován poruchou rovnovážného stavu organismu způsobenou celkovým rozvratem metabolismu v důsledku dlouhodobé hypoxie a acidózy. Ještě měsíce po intoxikaci mohou přetrvávat neurologické a neuropsychické příznaky jako depresivní stavy, poruchy spánku, emoční labilita, zvýšená únava a především poruchy paměti, koncentrace a učení (24,26).

Komplikací otravy OP/NPL také může být remise otravy způsobená uvolněním OP/NPL z depotních míst nebo jejich uvolněním z vazby na bílkoviny krevní plazmy (24).

### 3.10. DIAGNOSTIKA INTOXIKACÍ ORGANOFOSFOROVÝMI LÁTKAMI

Ke správné, ale především včasné diagnostice akutních intoxikací přispívá anamnéza společně s vyšetřením klinického stavu a laboratorní vyšetření krve.

Mezi klinické příznaky intoxikace, které upozorňují na možnou souvislost s OP/NPL jsou především poruchy zraku způsobené miózou a porušené akomodace, zvýšené pocení, slinění a slzení. Dále dechová tíseň, nevolnost a zvracení a abdominální bolesti spojené s defekací (24).

Nejvýznamnějším laboratorním vyšetřením při podezření na intoxikaci OP/NPL je stanovení aktivity cholinesteras, tedy konkrétně erytrocytární AChE či plazmatické BuChE. Výrazná inhibice těchto esteras prokazuje přímou souvislost s intoxikací OP/NPL, i když je nutné brát v úvahu také možnou intoxikaci karbamáty. Můžeme dokázat i přítomnost metabolitů OP/NPL v krvi nebo moči, čímž se dá odlišit právě intoxikace karbamáty od OP/NPL, nicméně k tomuto vyšetření je nutné použití moderních přístrojů s vysokou citlivostí detekce, tedy plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem. K nespecifickým laboratorním markerům také patří aktivita jaterních aminotransferas či leukocytóza (19,24).

### 3.11. FARMAKOLOGICKÁ PROFYLAXE INTOXIKACE ORGANOFOSFOROVÝMI LÁTKAMI

Termín profylaxe proti OP znamená užití léčebného opatření v relativně krátké době před expozicí OP/NPL za účelem ochrany organismu proti těmto toxickým sloučeninám, a to bez potřeby jakékoli následné terapie. Tento přístup lze také charakterizovat jinými slovy jako „preventivní léčba“.

Z mechanismu toxikologického účinku OP/NPL vyplývá, že preventivní opatření mohou být dosažena následujícími přístupy:

- Ochrana AChE proti ireverzibilní inhibici – k tomuto účelu mohou být použity látky ze skupiny reverzibilních inhibitorů AChE a látky snižující koncentraci OP/NPL v organismu, neboli enzymy hydrolyzující či vázající tyto látky, působící tedy jako tzv. „scavengery“
- Antagonizace nahromaděného ACh v důsledku inhibované AChE – k tomuto účelu slouží hlavně látky ze skupiny anticholinergik.

Jako další přístup, který v poslední době podléhá intenzivnímu výzkumu je možnost použití reaktivátorů AChE před expozicí toxické OP. Tedy použití jako tzv. „léčby v předstihu“.

#### 3.11.1. Proteiny-scavengery

Zachování funkční AChE může být zajištěno eliminací OP/NPL jejich eliminací dříve, než dorazí na místo svého účinku, tedy do tkání kde se vyskytuje právě AChE. Toho může být dosaženo podáním enzymů, které tyto toxické látky rozkládají nebo enzymů, které je jej vážou. Enzymy, které hydrolyzují OP/NPL se nazývají katalytické scavengery, a enzymy, které OP váží, se nazývají stechiometrické scavengery.

Katalytické scavengery mají velký potenciál v rychlé a efektivní ochraně AChE, jsou však stále předmětem výzkumu. Velmi slibně se jeví enzym paraoxonasa a enzymy jí podobné.

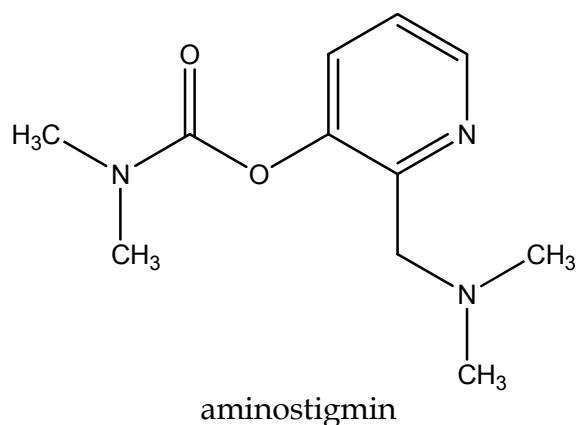
Na druhou stranu stechiometrické enzymy ze skupiny cholinesteras již prodělaly intenzivní výzkum jako potencionální scavengery. AChE byla použita jako ochrana proti intoxikaci OP u myši a vykazala souvislost mezi protekcí a její hladinou v krvi. BuChE a AChE se jeví jako velmi efektivní pro profylaxi proti OP/NPL (21). Tyto enzymy účinkují od první chvíle intoxikace OP/NPL, bez jakékoli interakce s cílovými tkáněmi a bez vedlejších účinků (21,33-34).

Efektivita cholinesteras jako scavengerů by mohla být podpořena podáním v kombinaci s reaktivátory cholinesteras. Reaktivovaný enzym by totiž mohl sloužit jako nový scavenger (21).

### **3.11.2. Reversibilní inhibitory**

Reverzibilní inhibitory slouží zatím jako jediná schválená skupina látek k užití v humánní medicíně k profylaktické terapii proti OP/NPL (21). Sloučeniny karbamátového typu reverzibilně blokují aktivní místo AChE a tím jej chrání proti účinku OP/NPL. Navíc prochází spontánní dekarbamylací se znovuobnovením normální funkce AChE.

Jako příklad látky ze skupiny reverzibilních IChE používaných k profylaxi proti intoxikaci OP/NPL je fysostigmin (Obr. 1) Tato látka je pro své účinky již dlouho známá a byla již předmětem mnoha studií (35). V rámci těchto studií byl prokázán příznivý efekt na ochranu AChE proti OP/NPL a to nejen u fysostigminu, ale i aminostigminu (Obr. 6), pyridostigminu (Obr. 1) a dalších. Zvláště výhodné vlastnosti prokázal aminostigmin díky svému centrálnímu účinku (21).



**Obrázek 6** aminostigmin

Z výsledků studií se jako neslibnější látka ze skupiny reverzibilních IChE ukázal pyridostigmin. Je rychle absorbován po orálním podání a hladina jeho maximální inhibice je dosažena za 2 – 3 hodiny a trvá více jak 8 hodin (36). Nicméně, pyridostigmin má kladný náboj, takže neprochází hematoencefalickou bariérou (21). Z tohoto důvodu se používá v kombinaci s léčivou s centrální anticholinergní aktivitou (např. benaktyzin) k snížení efektu OP/NPL v CNS. Tato léčiva navíc zmírňují nežádoucí účinky pyridostigminu. Díky těmto výsledkům byl pyridostigmin zaveden k používání k profylaktické terapii intoxikací OP/NPL do některých armád NATO (21).

I přesto, že jsou IChE karbamátového typu široce používány, vykazují velmi časté a vážné vedlejší účinky (37). Tyto nežádoucí účinky jsou při použití vyšších dávek způsobeny karbamylací aktivního místa AChE a projevují se zvýšenou salivací, bronchiální sekrecí, GIT motilitou, kardiální arytmii a mohou vést až k rozvoji cholinergní krize (37). Tyto nežádoucí účinky vedou k výzkumu potenciálních reverzibilních IChE se strukturou odlišnou od karbamátů. Jedna z látek s velice slibnými výsledky se zdá být huperzin A (21,38).

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. SYNTETICKÁ ČÁST

#### 4.1.1. Obecná syntetická část

Rozpouštědla a chemikálie (reagencie) byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (Česká Republika) a použity bez předchozího přečištění. Reakce byly monitorovány pomocí TLC (DC-Alufolien Cellulose F, Merck, Německo) za použití mobilní fáze butanol-CH<sub>3</sub>COOH-H<sub>2</sub>O 5:1:2 a detekovány Dragendorfovým činidlem (roztok obsahující 10 ml CH<sub>3</sub>COOH, 50 ml H<sub>2</sub>O a 5 ml základního roztoku připraveného smícháním dvou frakcí – frakce A: 850 mg Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 40 ml H<sub>2</sub>O, 10 ml CH<sub>3</sub>COOH; frakce B: 8 g KI, 20 ml H<sub>2</sub>O) Teploty tání byly změřeny na mikrobodotávku PHMK 05 (VEB Kombinat Nagema, Radebeul, Německo) a nebyly korigovány.

NMR spektra byla změřena na přístroji Varian Mercury-VxBB 300 (<sup>1</sup>H 300 MHz, <sup>13</sup>C 75 MHz, Palo Alto CA, USA). Hodnoty chemických posunů jsou ve všech případech uvedeny v ppm (δ) vzhledem k poměru signálu rozpouštědla (DMSO – δ 2.50 pro <sup>1</sup>H; δ 39.43 pro <sup>13</sup>C; D<sub>2</sub>O s přídavkem acetonu – δ 2.219 pro <sup>1</sup>H; δ 30.89 pro <sup>13</sup>C). Signály jsou uvedeny jako s (singlet), d (dublet), t (triplet) a m (multiplet).

ESI-MS spektra byla měřena s použitím HP1100 HPLC/MS systému dodaného z Agilent Technologies (Waldbronn, Německo). Skládá se z vakuového zplynovače G1322A, kvartérní pumpy G1311A, autosampleru G1313A a kvadrupólového hmotnostního spektrometru MSD1456 VL vybaveného zdrojem elektrospray-ionizace. Dusík pro hmotnostní spektrometr byl získán z dusíkového generátoru Whatman 75-720. Data byla odečtena v pozitivním iontovém modu s ESI sondou o napěti 4000 V. Tlak rozprašovaného plynu byl ustaven na 35 psig. Teplota sušícího plynu byla 335 DC a průtok 13 l/min.

Hodnoty logP byly spočítány za pomoci programu ACDLabs PhysChem Suite 12.0.2. (39).

#### 4.1.2. Příprava biskvarterních solí

Při přípravě nových sloučenin byla použita standardní strategie syntézy (40). 4-*tert*-butylpyridin (6.8 mmol) a odpovídající množství dihalogenované sloučeniny (3.1 mmol) byly rozpuštěny v DMF (10 ml). Směs byla zahřívána při 70 °C po 14 - 98 hodin (Schéma 3). Následně byla reakční směs ochlazena na laboratorní teplotu a k reakční směsi byl přidán v nadbytku aceton (80 ml) a byla uchována přes noc v lednici (5 °C). Surový krystalický produkt byl odfiltrován. Amorfní surový produkt byl dekantován, kapalná část reakční směsi odlita a zbytek rozpouštědla byl odpařen. Následně byl surový produkt vyčištěn povařením s ethyl-acetátem (50 ml). K určení charakteru a čistoty připravených látek byly provedeny NMR, ESI-MS a elementární analýza.

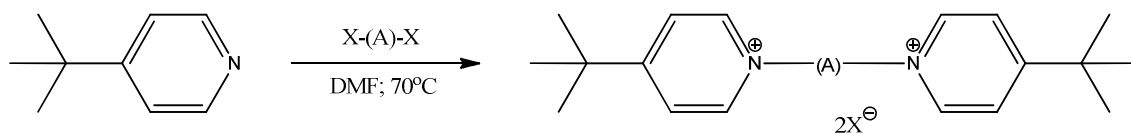
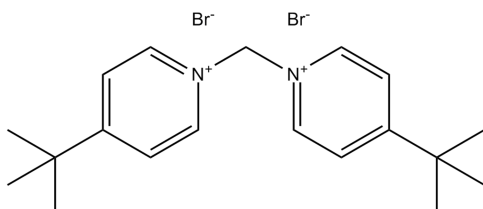


Schéma 3 Obecná příprava biskvarterních solí.

## 1,1'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-meth-1,1-diyl-dibromid

(1)



Výtěžek 33 %.

T.t. 268 - 270 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 9.11 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.28 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 7.27 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.41 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

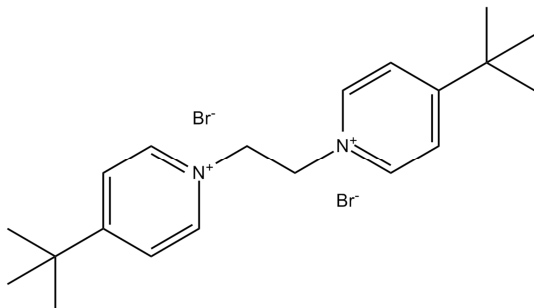
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 144.49, 127.34, 77.13, 37.41, 30.89, 29.52.

ESI-MS:  $m/z$  142.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 142.11)

EA: vypočteno 51.37 % C, 6.35 % H, 6.31 % N; nalezeno 51.16 % C, 6.65 % H, 6.25 % N.

## 1,2'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-eth-1,2-diyl-dibromid

(2)



Výtěžek 48 %.

T.t. 147 - 149 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.64 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.11 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 5.28 - 5.21 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

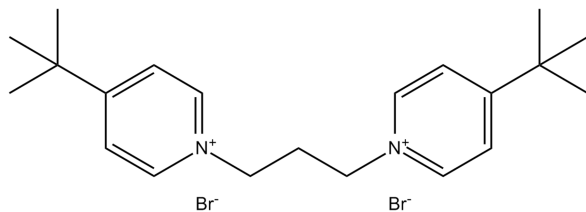
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 144.28, 126.88, 59.91, 36.98, 30.88, 29.62.

ESI-MS:  $m/z$  149.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 149.12).

EA: vypočteno 52.42 % C, 6.60 % H, 6.11 % N; nalezeno 52.62 % C, 6.52 % H, 5.71 % N.

### 1,3'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-prop-1,3-diyl-dibromid

(3)



Výtěžek 76 %.

T.t. 176 - 178 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.74 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.09 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.72 (t, 4H,  $J = 7.7$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.81 - 2.69 (m, 2H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

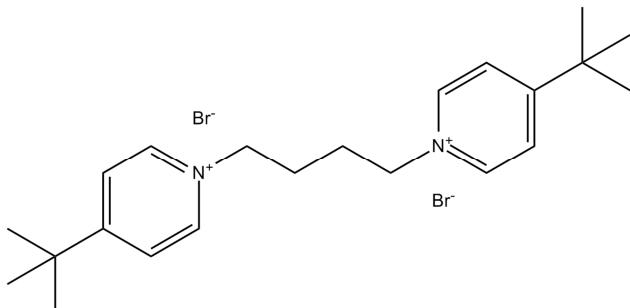
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 144.07, 126.40, 57.75, 36.71, 32.25, 30.89, 29.67.

ESI-MS:  $m/z$  156.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 156.13).

EA: vypočteno 53.40 % C, 6.83 % H, 5.93 % N; nalezeno 52.99 % C, 7.32 % H, 5.57 % N.

## 1,4'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-but-1,4-diyl-dibromid

(4)



Výtěžek 22 %.

T.t. 241 - 243 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.70 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.08 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.65 - 4.58 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ ), 2.13-2.04 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.41 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

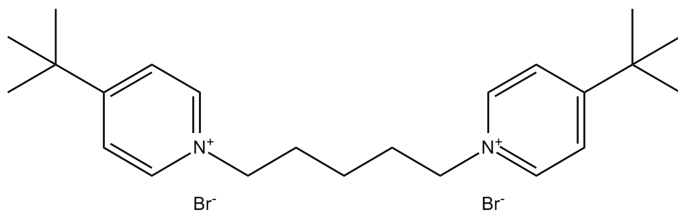
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 142.75, 124.97, 59.16, 35.43, 29.70, 28.50, 26.63.

ESI-MS:  $m/z$  163.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 163.14).

EA: vypočteno 54.33 % C, 7.05 % H, 5.76 % N; nalezeno 54.09 % C, 7.40 % H, 5.40 % N.

## 1,5'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-pent-1,5-diyl-dibromid

(5)



Výtěžek 98 %.

T.t. neměřena (amorfní)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 8.67 (d, 4H, *J* = 5.9 Hz, H-2,2',6,6'), 8.05 (d, 4H, *J* = 5.9 Hz, H-3,3',5,5'), 4.53 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz, N-CH<sub>2</sub>), 2.10 - 1.96 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.46 - 1.28 (m, 20H, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>; CH<sub>3</sub>).

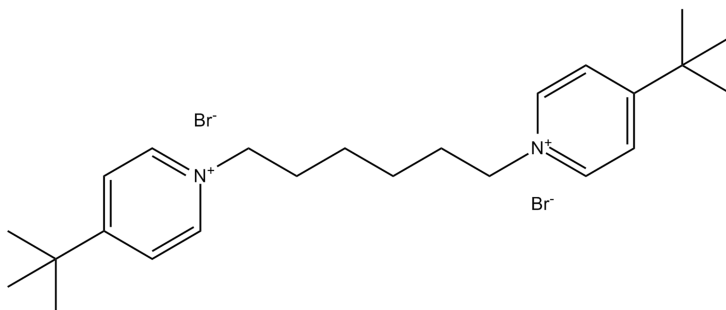
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 144.00, 126.10, 61.01, 36.66, 35.22, 30.58, 29.80, 27.86.

ESI-MS: *m/z* 170.0 [M<sup>2+</sup>/2] (vypočteno pro [C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub><sup>2+</sup>/2] 170.15).

EA: neměřena (amorfní)

## 1,6'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-hex-1,6-diyl-dibromid

(6)



Výtěžek 33 %.

T.t. 281 - 282 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.71 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.08 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.56 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.09 - 1.95 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.51 - 1.34 (m, 22H, N-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ - $\text{CH}_2$ ;  $\text{CH}_3$ ).

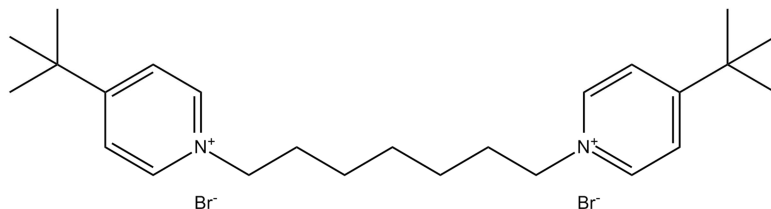
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 142.82, 124.87, 60.12, 35.46, 29.80, 29.73, 28.62, 24.31.

ESI-MS:  $m/z$  177.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 177.15).

EA: vypočteno 56.04 % C, 7.45 % H, 5.45 % N; nalezeno 56.27 % C, 7.91 % H, 5.38 % N.

## 1,7'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-hept-1,7-diyl-dibromid

(7)



Výtěžek 45 %.

T.t. 208 – 210 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.68 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.05 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.52 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.04 – 1.90 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.47 – 1.22 (m, 24H, N-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub>;  $\text{CH}_3$ ).

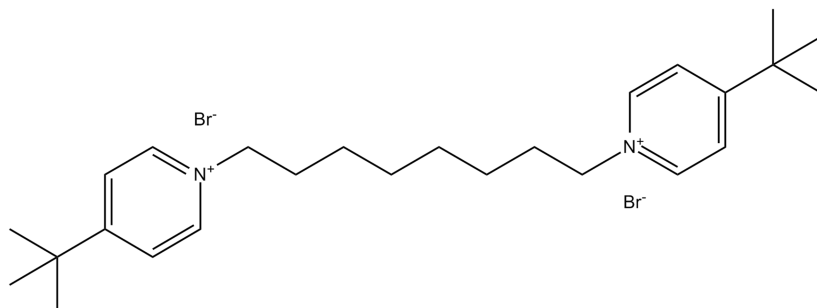
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 142.81, 124.85, 60.24, 35.46, 29.80, 28.64, 27.00, 24.50.

ESI-MS:  $m/z$  184.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 184.16).

EA: vypočteno 56.83 % C, 7.63 % H, 5.30 % N; nalezeno 56.49 % C, 8.03 % H, 5.08 % N.

## 1,8'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-okt-1,8-diyl-dibromid

(8)



Výtěžek 36 %.

T.t. 228 – 230 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.67 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.05 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.52 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.04 – 1.89 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ), 1.35 – 1.26 (m, 8H, N-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ -( $\text{CH}_2$ ) $_4$ ).

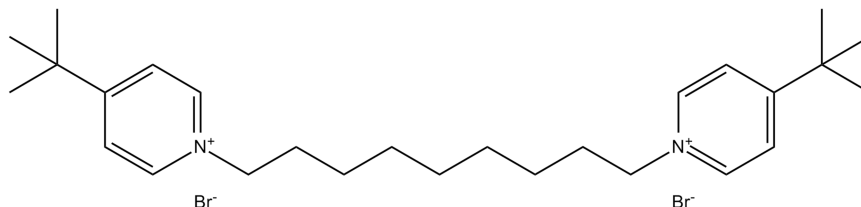
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 142.75, 124.77, 60.28, 35.40, 29.80, 28.59, 27.31, 24.59.

ESI-MS:  $m/z$  191.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 191.17).

EA: vypočteno 57.57 % C, 7.80 % H, 5.16 % N; nalezeno 57.20 % C, 8.23 % H, 5.02 % N.

## 1,9'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-non-1,9-diyl-dibromid

(9)



Výtěžek 57 %.

T.t. neměřena (amorfní)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.67 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.05 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.52 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.03 - 1.89 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ), 1.34 - 1.20 (m, 10H, N-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ -( $\text{CH}_2$ ) $_5$ ).

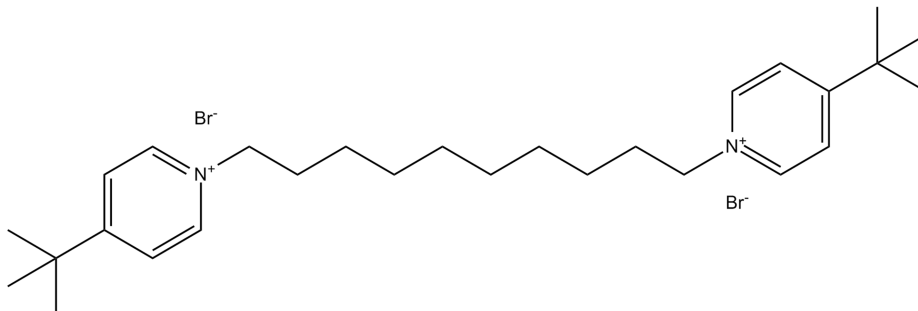
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 142.82, 124.83, 60.37, 35.46, 29.88, 28.65, 27.64, 27.39, 24.62.

ESI-MS:  $m/z$  198.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 198.18).

EA: neměřena (amorfní)

## 1,10'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-dek-1,10-diyl-dibromid

(10)



Výtěžek 63 %.

T.t. 105 – 107 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.67 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.05 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.52 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.04 – 1.89 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ), 1.34 – 1.18 (m, 12H, N-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ -( $\text{CH}_2$ ) $_6$ ).

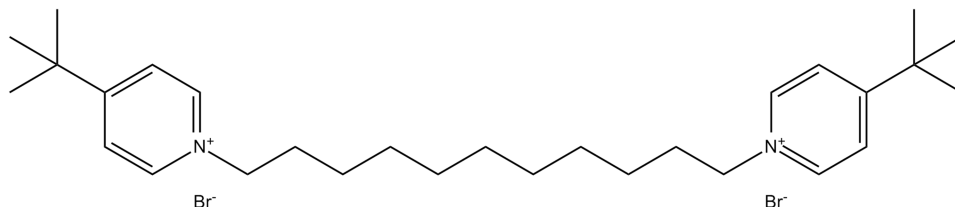
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 142.83, 124.83, 60.40, 35.47, 29.87, 28.66, 27.79, 27.48, 24.68.

ESI-MS:  $m/z$  205.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 205.19).

EA: vypočteno 58.95 % C, 8.13 % H, 4.91 % N; nalezeno 59.01 % C, 8.32 % H, 4.70% N.

## 1,11'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-undek-1,11-diyl-dibromid

(11)



Výtěžek 89 %.

T.t. neměřena (amorfní)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.67 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.05 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.52 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.04 - 1.89 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ), 1.35 - 1.13 (m, 14H, N-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ -( $\text{CH}_2$ ) $_7$ ).

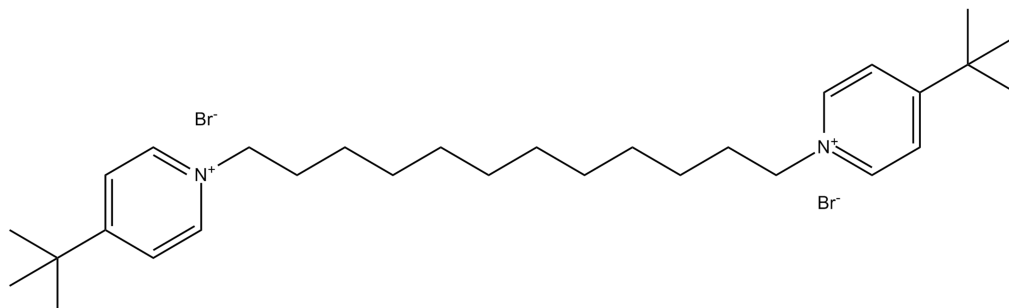
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 142.83, 124.83, 60.40, 35.47, 29.87, 28.67, 27.87, 27.54, 24.67.

ESI-MS:  $m/z$  212.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 212.19).

EA: neměřena (amorfní)

**1,12'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-dodek-1,12-diyl-dibromid**

(12)



Výtěžek 82 %.

T.t. 172 - 174 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.67 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.04 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.51 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.02 - 1.88 (m, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.38 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ), 1.33 - 1.13 (m, 16H, N-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ -( $\text{CH}_2$ ) $_8$ ).

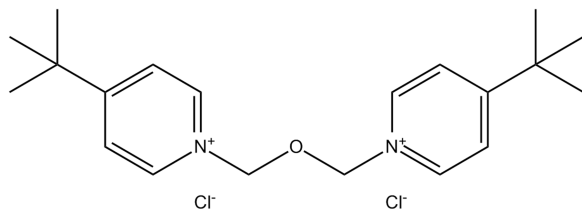
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 143.85, 125.85, 61.42, 36.49, 29.68, 29.02, 28.96, 28.53, 25.66.

ESI-MS:  $m/z$  219.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 219.20).

EA: vypočteno 60.20 % C, 8.42 % H, 4.68 % N; nalezeno 59.82 % C, 8.75 % H, 4.72 % N.

## 1,3'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-2-oxaprop-1,3-diyl-dichlorid

(13)



Výtěžek 56 %.

T.t. rozklad při 231 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.85 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.13 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 6.17 (s, 4H, N- $\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

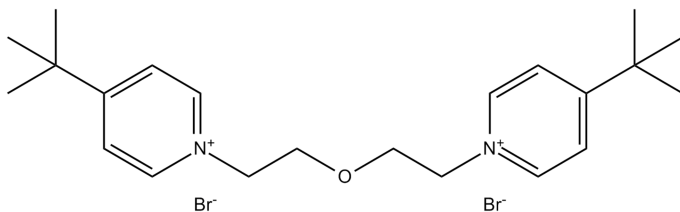
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 143.18, 126.37, 87.46, 37.13, 29.65.

ESI-MS:  $m/z$  157.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}^{2+}/2$ ] 157.12).

EA: vypočteno 62.33 % C, 7.85 % H, 7.27 % N; nalezeno 61.88 % C, 7.68 % H, 7.59 % N.

## 1,5'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-3-oxapent-1,5-diyl-dibromid

(14)



Výtěžek 61 %.

T.t. 219 - 221 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.65 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.04 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.71 (t, 4H,  $J = 4.7$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 3.97 (t, 4H,  $J = 4.7$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 1.40 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

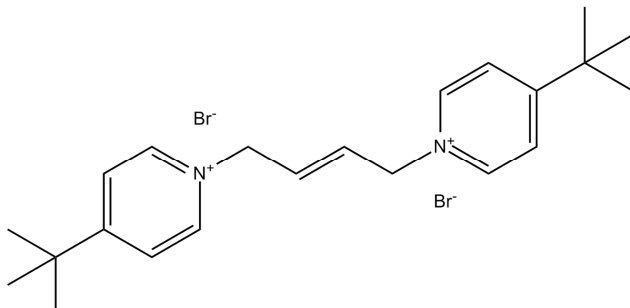
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 144.38, 125.72, 69.51, 60.70, 36.69, 29.78.

ESI-MS:  $m/z$  171.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}^{2+}/2$ ] 171.14).

EA: vypočteno 52.60 % C, 6.82 % H, 5.58 % N; nalezeno 52.81 % C, 7.02 % H, 5.35% N.

**1,4'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-but-(2*E*)-en-1,4-diyl-dibromid**

(15)



Výtěžek 99 %.

T.t. 242 - 244 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.67 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.08 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 6.23-6.18 (m, 2H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 5.27 - 5.22 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

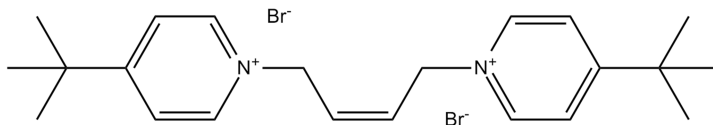
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 144.04, 130.55, 126.23, 61.33, 36.70, 29.68.

ESI-MS:  $m/z$  162.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 162.13).

EA: vypočteno 54.56 % C, 6.66 % H, 5.78 % N; nalezeno 54.12 % C, 7.05 % H, 5.59 % N.

## 1,4'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-but-(2I)-en-1,4-diyl-dibromid

(16)



Výtěžek 68 %.

T.t. neměřena (amorfní)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.73 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.11 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 6.20 – 6.15 (m, 2H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 5.46 (d, 4H,  $J = 4.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 1.40 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

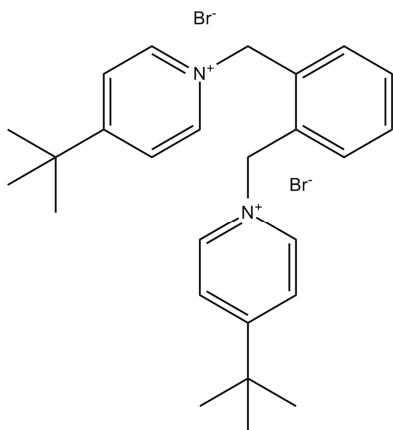
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 144.02, 129.03, 126.28, 57.38, 36.71, 29.69.

ESI-MS:  $m/z$  162.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 162.13).

EA: neměřena (amorfní)

## 1,1'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-1,2-fenyldimethylenyl-dibromid

(17)



Výtěžek 85 %.

T.t. 263 - 265 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.65 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.07 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 7.61 - 7.57 (m, 2H, Ph), 7.31 - 7.25 (m, 2H, Ph), 5.93 (s, 4H, N- $\text{CH}_2$ ), 1.38 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

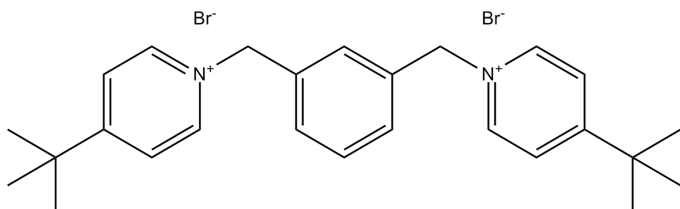
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 144.15, 131.90, 131.65, 131.37, 126.39, 60.72, 36.79, 29.71.

ESI-MS:  $m/z$  187.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 187.14).

EA: vypočteno 58.44 % C, 6.41 % H, 5.24 % N; nalezeno 57.92 % C, 6.78 % H, 5.26 % N.

## 1,1'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-1,3-fenyldimethylenyl-dibromid

(18)



Výtěžek 89 %.

T.t. 250 – 252 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.73 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.05 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 7.58 – 7.44 (m, 4H, Ph), 5.76 (s, 4H, N- $\text{CH}_2$ ), 1.37 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

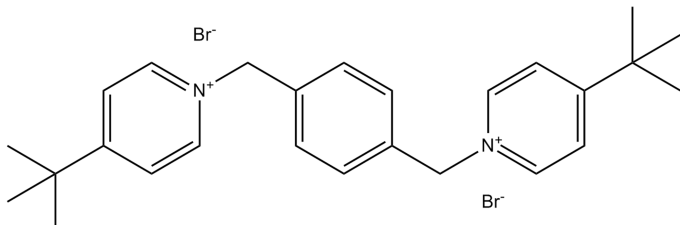
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 144.14, 135.01, 131.28, 130.59, 129.57, 126.24, 63.58, 36.69, 29.69.

ESI-MS:  $m/z$  187.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 187.14).

EA: vypočteno 58.44 % C, 6.41 % H, 5.24 % N; nalezeno 58.08 % C, 6.80 % H, 5.16 % N.

## 1,1'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-1,4-fenyldimethylenyl-dibromid

(19)



Výtěžek 96 %.

T.t. rozklad při 313 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.73 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.05 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 7.51 – 7.47 (m, 4H, Ph), 5.76 (s, 4H, N- $\text{CH}_2$ ), 1.37 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

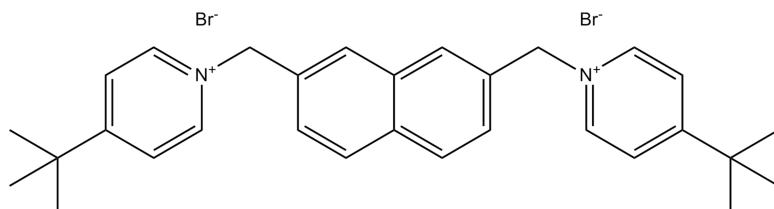
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 144.15, 135.21, 130.34, 126.25, 63.53, 36.67, 29.68.

ESI-MS:  $m/z$  187.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 187.14).

EA: vypočteno 58.44 % C, 6.41 % H, 5.24 % N; nalezeno 58.43 % C, 6.78 % H, 5.22 % N.

## 1,1'-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-3,6-naftyldimethylenyl-dibromid

(20)



Výtěžek 99 %.

T.t. 209 – 211 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8.78 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.05 (s, 2H, Nph), 7.99 (d, 4H,  $J = 5.9$  Hz, H-3,3',5,5'), 7.91 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, Nph), 7.46 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, Nph), 5.86 (s, 4H, N- $\text{CH}_2$ ), 1.27 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 144.12, 133.85, 133.44, 132.44, 130.05, 129.57, 127.34, 126.22, 64.11, 36.64, 29.66.

ESI-MS:  $m/z$  212.0 [ $\text{M}^{2+}/2$ ] (vypočteno pro [ $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_2^{2+}/2$ ] 212.15).

EA: vypočteno 61.65 % C, 6.21 % H, 4.79 % N; nalezeno 61.21 % C, 6.54 % H, 4.59 % N

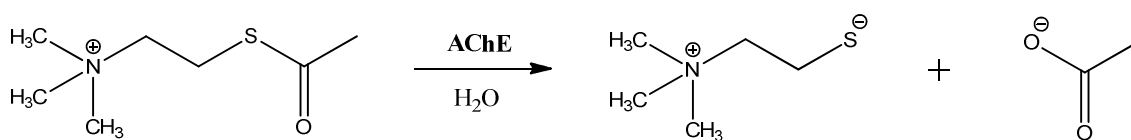
## 4.2. STANOVENÍ INHIBIČNÍCH PARAMETRŮ ELLMANOVOU METODOU *IN VITRO*

### 4.2.1. Princip metody

Pro stanovení inhibiční aktivity nově připravených látek byla vybrána fotometrická metoda, známá jako metoda Ellmanova. Tato spektrofotometrická metoda je velice citlivá a může být použita na měření i velmi malých koncentrací enzymu.

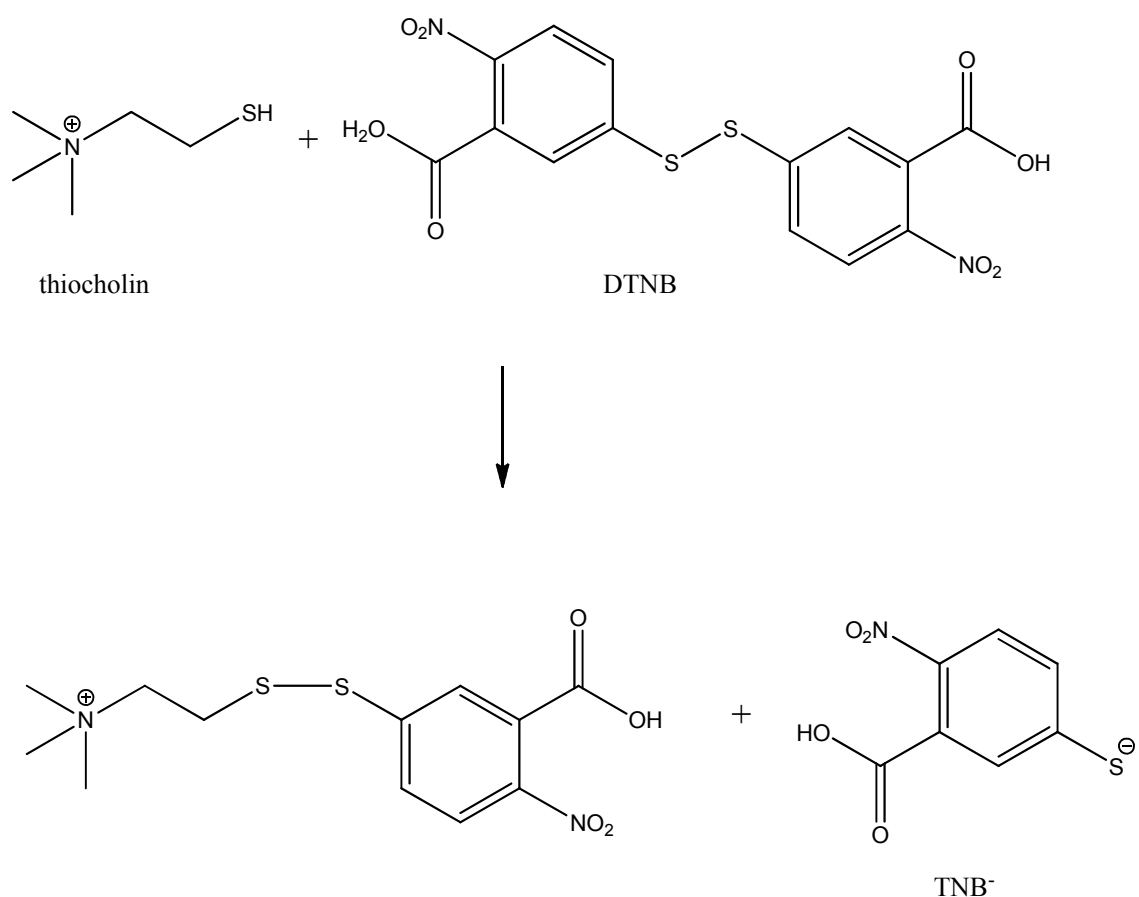
Pro tuto metodu jsme použili jako substrát lidskou rekombinantní AChE a lidskou plasmatickou BuChE, jako přirozené enzymy, na které by měla být zaměřena profylaktická terapie intoxikace OP/NPL nově připravenými sloučeninami.

Principem této metody je měření stupně hydrolýzy acetylthiocholinu jako substrátu pro AChE a butyrylthiocholinu jako substrátu pro BuChE. Po enzymové hydrolýze substrátu příslušným enzymem se uvolňuje thiocholin a zbytek příslušné kyseliny (Schéma 4).



**Schéma 4** Hydrolýza acetylthiocholinu na thiocholin a acetát.

Thiocholin obsahující -SH skupinu pak reaguje s 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB) a dochází k uvolnění 5-sulfanyl-2-nitrobenzoového aniontu (TNB-) nesoucího v roztoku žluté zbarvení (Schéma 5). Barevný produkt je pak spektrofotometricky stanoven při vlnové délce 412 nm (41).



**Schéma 5** Reakce vzniku TNB<sup>-</sup>.

#### 4.2.2. Postup měření inhibiční aktivity

Inhibiční aktivita připravených látek byla měřena pomocí vícekomorového spektrofotometru Sunrise (Tecan, Salzburg, Rakousko). Jako reakční kyvety byly zvoleny standardní polystyrenové destičky s 96 komůrkami (Nunc, Rochlide, Dánsko). Měření proběhlo za standartní teploty a tlaku (25 °C, 100 kPa).

Lidská rekombinantní AChE nebo lidská plasmatická BuChE (Aldrich; komerčně čištěny pomocí afinitní chromatografie) byly rozpouštěny ve fosfátovém pufru (pH 7.4) až k dosažení jejich aktivity 0.002 U/μl. Poté byl roztok příslušné cholinesterasy ve fosfátovém pufru (5 μl) rozpuštěn v komůrkách kyvety v ještě větším množství fosfátového pufru (20 μl) a byl přidán čerstvě namíchaný roztok 0.4 mg/ml DTNB. Do komůrek byl následně

přidán připravený testovaný inhibitor (100 mM – 1 nM; 5 µl) a celá směs se ponechala k inkubaci po dobu 5 minut. Poté byl do každé komůrky přidán acetylthiocholin-chlorid v koncentraci 1 mM ve fosfátovém pufru (20 µl). Po dalších 5 minutách inkubace byla směs protřepána za pomoci automatického systému a změřena absorbance při vlnové délce 412 nm.

Procento inhibice (I) bylo vypočítáno z naměřených hodnot podle následujícího vzorce:

$$I = \left( 1 - \frac{\Delta A_i}{\Delta A_0} \right) \times 100$$

$\Delta A_i$  značí změnu absorbance způsobenou cholinesterasou vystavenou působení anticholinergní látky.

$\Delta A_0$  značí změnu absorbance způsobenou neinhibovanou cholinesterasou, kde místo anticholinergní látky byl přidán pouze fosfátový pufr.

IC<sub>50</sub> byla určena za použití programu Origin 6.1 (Northampton, MA, USA) Procento inhibice bylo vypočítáno pomocí metody Hillova odhadu (n = 1). Jiné metody odhadu se ukázaly jako méně optimální a korelační koeficient se ukázal nižší v porovnání s použitou metodou.

### 4.2.3. Postup měření kinetiky enzymu

Během měření byla použita lidská rekombinantní AChE (Aldrich). Pro měření její aktivity byla opět použita Ellmanova fotometrická metoda. Do polystyrenové kyvety bylo přeneseno DTNB (0.4 ml) v koncentraci 0.4 mg/ml, roztok AChE s celkovou aktivitou 0.5 µkat ve fyziologickém roztoku upraveným fosfátovým pufrem (FyzR; 25 µl), testovaný inhibitor (25 µl) a FyzR (450 µl). Tato směs byla jemně protřepána. Reakce byla nastartována přidáním acetylthiocholinu v různých koncentracích (0.1 mM – 1 M) ve FyzR (100 µl).

Tvořící se TNB<sup>-</sup> v roztoku, který mu propůjčuje žluté zbarvení, pak byl fotometricky měřen při vlnové délce 412 nm proti slepému pokusu (směs DTNB a acetylthiocholinu v příslušných koncentracích). Vyloučena byla spontánní reakce mezi testovaným inhibitorem a DTNB po inkubaci reakční směsi bez AChE, nahrazenou FyzR (25 μl). Inhibice byla vyhodnocena pomocí Lineweaver-Burkovy metody nastavené pro příslušnou koncentraci inhibitoru (10<sup>-8</sup> – 10<sup>-2</sup> mol/l) a koncentraci acetylthiocholinu (10<sup>-5</sup> – 10<sup>-1</sup> M). Všechna měření byla provedená třikrát a pro metodické stanovení byla použita jejich průměrná hodnota.

Získaná data byla zpracována za použití programu Origin 8.0 (Northampton, MA, USA). Konstanty byly vypočteny z enzymové kinetiky Lineweaver-Burkovy metody (dvojitě reciproční metoda). Nakonec byla dle následujícího vzorce vypočtena disociační konstanta AChE pro komplex enzym-inhibitor ( $K_{i1}$ ) a disociační konstanta pro komplex enzym-inhibitor-substrát ( $K_{i2}$ ):

$$K_{i1} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad K_{i2} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

#### 4.2.4. Postup molekulárního modelování

Výpočty molekulárních modelů byly provedeny za pomoci programu Autodock 4.0.1. (42). Modely molekul byly vytvořeny a zmenšeny pomocí UCSF Chimera 1.3. (43). Struktury AChE druhu *Mus musculus* a lidské BuChE byly připraveny za použití Pymol 1.1 z jejich krystalických struktur (kódy pdb: 1b41, 2jez, 2jf0 a 1p0i) (44,45).

Vybrané molekuly inhibitorů společně s AChE a BuChE byly připraveny v nabitých formách za použití Autodock Tools 1.5.2. (42). Byla vytvořena 3D afinitní mřížka, která zahrnovala celá aktivní a periferní místa enzymů AChE a BuChE. Počet bodů mřížky byl nastaven na hodnoty 110, 110 a 110 pro osy x-, y- a z- s jednotlivými body vzdálenými 0.253 Å. Výpočty modelů byly

nastaveny na 50 sérií. Na konci výpočtů, program Autodock provedl analýzu získaných hodnot.

#### 4.2.5. Výsledky měření

Nově připravené sloučeniny a již známé inhibitory vybrané jako standardy pro porovnání byly testovány *in vitro*. Hodnoty výsledků pro všechny sloučeniny jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 1).

Molekula	AChE IC <sub>50</sub> ±SD (μM) <sup>[a]</sup>	BuChE IC <sub>50</sub> ±SD (μM) <sup>[a]</sup>	SI <sup>[c]</sup> BChE /AChE	K <sub>i1</sub> /K <sub>i2</sub> (μM)	logP
pralidoxim	878±171	--- <sup>[b]</sup>	---	---	-2.46
obidoxim	577±113	1910±311	3.3	---	-2.42
BW284c51	0.030±0.006	354±58	11800	0.01/0.05	-6.19
ethopropazin	1020±199	1.6±0.3	0.002	24.7/12100	5.11
<b>1</b>	20±4	34±6	1.7	---	2.29
<b>2</b>	17±3	20±3	1.2	---	1.35
<b>3</b>	14±3	53±9	3.8	---	0.95
<b>4</b>	3.7±0.7	5.5±0.9	1.5	---	0.68
<b>5</b>	24±5	5.1±0.8	0.2	---	0.56
<b>6</b>	0.032±0.006	0.6±0.1	19	---	0.67
<b>7</b>	0.016±0.003	0.7±0.1	44	---	0.87
<b>8</b>	0.005±0.0009	0.016±0.003	3.2	0.09/0.20	1.08
<b>9</b>	0.037±0.007	0.15±0.02	4.1	---	1.37
<b>10</b>	0.012±0.002	0.06±0.01	5.0	---	1.66
<b>11</b>	0.026±0.005	0.11±0.02	4.2	---	2.01

<b>12</b>	0.007±0.001	0.019±0.003	2.7	---	2.33
<b>13</b>	12±2	75±12	6.2	---	1.73
<b>14</b>	19±4	241±40	13	---	0.11
<b>15</b>	3.4±0.7	19±3	5.6	---	0.92
<b>16</b>	2.0±0.4	4.4±0.7	2.2	---	0.92
<b>17</b>	10±2	2.4±0.5	0.2	---	1.42
<b>18</b>	0.7±0.1	1.9±0.3	2.7	---	1.42
<b>19</b>	0.30±0.06	1.3±0.2	4.3	---	1.42
<b>20</b>	0.024±0.005	0.12±0.02	5	0.10/0.10	2.54

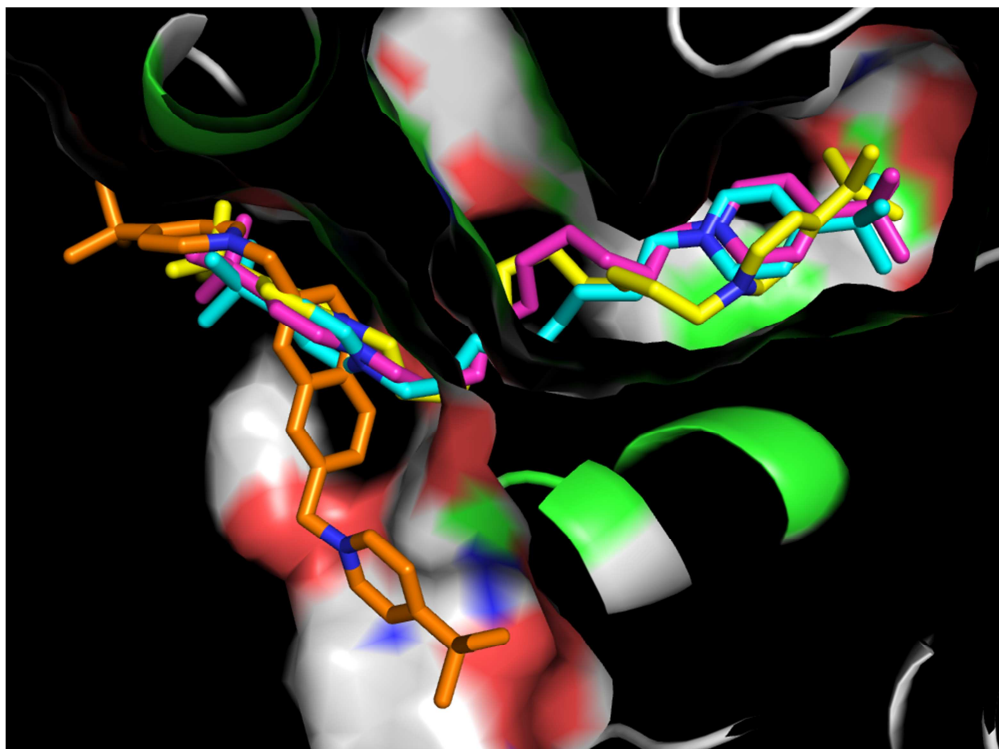
<sup>a</sup> hodnota tří na sobě nezávislých měření

<sup>b</sup> žádná inhibice v určené koncentrační stupnici

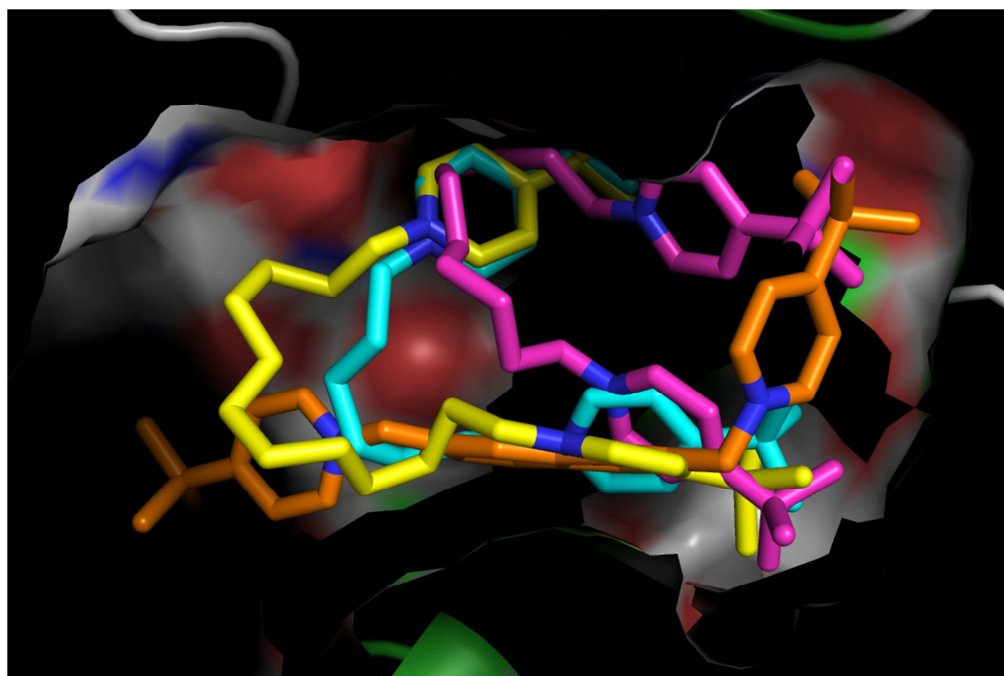
<sup>c</sup> Index selektivity

#### **Tabulka 1** Výsledky *in vitro* měření

Pro studium modelů molekul v aktivním místě enzymu byly vybrány čtyři perspektivní molekuly (**8**, **10**, **12** a **20**) na základě výsledků testování jejich inhibičních vlastností. Tento výpočet byl prováděn kvůli potvrzení a vysvětlení jejich možných interakcí s enzymy. Výsledky molekulového modelování jsou ukázány na následujících obrázcích (Obr. 7-8).



**Obrázek 7** Výsledný model vybraných molekul inhibitorů pro inhibici AChE rodu *Mus musculus*. Sloučenina 8 - modrá, 10 - fialová, 12 - žlutá a 20 - oranžová.



**Obrázek 8** Výsledný model vybraných molekul inhibitorů pro lidskou BuChE. Sloučenina 8 - modrá, 10 - fialová, 12 - žlutá a 20 - oranžová.

## 5. DISKUSE

Dříve připravené a nově připravené sloučeniny byly vybrány pro jejich předpokládanou inhibiční aktivitu pro testování *in vitro*, kdy byl použit standardní inhibiční test používající lidskou rekombinantní AChE a lidskou plazmatickou BuChE. Lidská AChE byla vybrána jakožto hlavní cíl profylaktické terapie, kdežto BuChE byla vybrána jako člen rodiny cholinesteras, který reaguje s podobnými molekulami jako AChE. Komerčně vyráběné oximy (pralidoxim, obidoxim) byly zvoleny jako standardy, jelikož by mohly sloužit k profylaktické terapii. Látky BW284c51 a ethopropazin byly zvoleny pro svou schopnost selektivní inhibice a byly dobrým porovnáním pro selektivitu nově připravených molekul. Komerční oximy použité jako referenční látky ukázaly slabou schopnost inhibice AChE v koncentračním rozmezí mM a nezdají se být relevantními léčivy pro profylaktické použití při intoxikaci OP/NPL (46). Další standardy, vybrané kvůli své selektivitě, prokázaly předpokládané výsledky pro AChE, zatímco BW284c51 se ukázala jako nadějný inhibitor AChE v rozmezí nM, ethopropazin byl inhibitorem velmi slabým (37).

Nově připravené sloučeniny při testování dosáhly různých výsledků. Sloučeniny **1 – 5** a **13 – 19** se ukázaly jako inhibitory AChE v  $\mu\text{M}$  koncentračním rozmezí. Sloučeniny **6 – 12** a **20** se projevíly jako inhibitory AChE již v koncentracích v nM řádu. Některé z připravených sloučenin (**7, 8, 10, 11, 12, 20**) převyšovaly ve své inhibiční aktivitě pro AChE vybraný komerční standard BW284c51 (30 nM). Z nich sloučeniny **8** (5 nM), **10** (12 nM) a **16** (7 nM) jsou perspektivními inhibitory AChE s alifatickým typem spojovacího řetězce a látka **20** (24 nM) je perspektivní inhibitor AChE s jiným, nealifatickým spojovacím řetězcem.

Pro BuChE, komerční reaktivátory opět neprokázaly dobrou inhibici, kdy pralidoxim neprokázal inhibici žádnou. Pro námi vybrané selektivní standardy, ethopropazin projevily předpokládanou inhibiční schopnost při koncentracích

v  $\mu\text{M}$  řádu, zatímco látka BW284c51 se ukázala jako velmi špatný inhibitor BuChE (37).

Stejně jako u výsledků inhibice AChE, některé připravené sloučeniny (1 – 5, 13 – 19) prokázaly inhibici BuChE v koncentracích  $\mu\text{M}$ . Dále látky 6 - 7, 9, 11 a 20 prokázaly inhibici BuChE v sub- $\mu\text{M}$  koncentracích, z nichž 6 – 12 a 20 převyšovaly komerční standardy. Nejzajímavější výsledky při inhibici BuChE měly sloučeniny 8, 10 a 12, které BuChE inhibují již v koncentracích nM.

Vzhledem k vypočítané selektivitě, ukázal pralidoxim jistou selektivitu pro AChE a obidoxim neukázal selektivitu žádnou. Z vybraných standardů žádný neukázal překvapivé výsledky, sloučenina BW284c51 měla vysokou selektivitu pro AChE a ethopropazin pro BuChE v souladu s dostupnou literaturou. Námi připravené sloučeniny neprokázali vyšší selektivitu vůči jednomu z enzymů proti standardům (37).

Z výsledků testování můžeme vyvodit určité závěry ke vztahu struktury vzhledem k aktivitě nově připravených molekul.

Bylo zjištěno, že pyridiniová část molekuly je velmi efektivní v tvorbě silné kation- $\pi$  interakce, namísto slabší  $\pi$ - $\pi$  interakce, kterou tvoří např. benzenový kruh (47). Navíc, molekuly bis-pyridiniového a bis-isochinoliniového typu již dříve prokázaly svou inhibiční aktivitu ve vztahu k AChE a BuChE (40, 48) a jejich následná substituce různými funkčními skupinami by mohla být dalším faktorem v ovlivnění jejich fyzikálně-chemických vlastností (např. změna lipofility). Zvolená *tert*-butylová struktura měla zvýšit lipofilitu námi připravených molekul. Byly očekávány interakce mezi cholinesterasami a 4-*tert*-butylovou částí molekul a tato hypotéza byla potvrzena nálezem CH- $\pi$  nebo CH-CH interakcí během molekulárního modelování sloučenin 8, 10, 12 a 24 u AChE a BuChE (49). Z tohoto důvodu je možné tvrdit, že *tert*-butylpyridiniová část molekuly je vhodná pro zvýšení slabých interakcí s molekulami cholinesteras (37).

Zatímco *tert*-butylpyridiniová část molekul byla součástí všech námi připravených sloučenin, spojovací řetězec se lišil. Tento řetězec nejen

ovlivňoval interakce s cholinesterasami, ale také měl vliv na výslednou lipofilitu molekul. Na základě dat získaných *in vitro* testováním jsme zjistili, že látky s kratším alifatickým spojovacím řetězcem C<sub>1</sub> – C<sub>5</sub> (**1 – 5**), s alifatickým řetězcem nesoucím heteroatom (**13 – 14**), řetězce s dvojnou vazbou (**15 – 16**) nebo řetězce nesoucí xylenový zbytek (**17 – 19**) jsou efektivními inhibitory lidské AChE pouze při koncentraci v μM. Naproti tomu látky mající delší alifatický řetězec C<sub>6</sub> – C<sub>12</sub> (**6 – 12**) a naftylenový řetězec (**20**) jsou slibnými inhibitory AChE v nM koncentracích.

Zvýšenou schopnost inhibice u látek **6 – 12** a **20** lze vysvětlit jejich schopností snadněji pronikat do aktivního místa AChE a BuChE a vázat se zde na esenciální aromatické zbytky (Trp, Tyr, Phe, His). Zajímavostí je, že sloučeniny nesoucí spojovací řetězec se sudým počtem uhlíků C<sub>8</sub> – C<sub>10</sub> – C<sub>12</sub> (**8, 10, 12**) jsou lepšími inhibitory než ty s lichým počtem uhlíků v řetězci (**7, 9, 11**). Sloučenina s naftylenovým řetězcem (**20**) se ukázala mírně slabším inhibitorem v porovnání se sloučeninami nesoucími alifatický spojovací řetězec (**7, 8, 10, 12**). Toto zjištění vede k závěru, že sloučenina **20** má prostorově méně ohebnou molekulu s omezenou volnou rotací, a proto ukázala odlišné interakce molekuly ve srovnání se sloučeninami s alifatickým řetězcem (37).

Vypočtené hodnoty logP pro nově připravené sloučeniny ukázaly velmi zajímavé výsledky. U molekuly s nejkratším C<sub>1</sub> řetězcem (**1**; logP 2.29) bylo zjištěno, že hodnota její logP se blíží látce s C<sub>12</sub> (**12**; logP 2.33) nebo naftylenovým (**20**; logP 2.54) řetězcem, i přes to, že by měla mít nejnižší logP z řady sloučenin s alifatickým řetězcem. Stejně tak lipofilita sloučeniny s C<sub>2</sub> spojovacím řetězcem (**2**; logP 1.35) je podobná molekule s C<sub>9</sub> (**9**; logP 1.37) řetězcem. Tento fenomén lze hypoteticky vysvětlit prostorovým cloněním kvartérního dusíku pyridiniovými kruhy, které jsou u sloučenin s kratším řetězcem (**1 – 4**) blízko u sebe. U molekul s delším alifatickým spojovacím řetězcem (**5 – 12**) se hodnoty logP zvyšují s narůstající délkou řetězce, jak by bylo možné očekávat. Navíc u sloučeniny **15** (**15**; logP 1.73) je hodnota logP vyšší, než u molekuly s analogickým alifatickým spojovacím řetězcem (**5**; logP

0.95) a mnohem vyšší než u delšího analogu (**14**; logP 0.11). V tomto případě se uplatňuje stejný fenomén, který byl popsán výše. Je také možné, že zde hraje roli i další faktor, a to konjugace volných párů atomu kyslíku s aromatickým kruhem, což by mohlo vést ke zvýšení lipofility u sloučeniny **17**. Na základě výsledků *in vitro* testování molekulárního modelování a hodnot lipofility, sloučeniny s delším alifatickým řetězcem (**8**, **10**, **12**) a s naftylenovým řetězcem (**20**) byly doporučeny k dalšímu výzkumu *in vivo* (37).

U sloučeniny **17** (SAD-128) byla již dříve zjištěna její schopnost působit jako inhibitor cholinergních receptorů. Konkrétně byla tato látka popsána jako reverzibilní inhibitor mAChR a nAChR společně se svými analogy (**2-10**) (50). Bohužel data z inhibice receptorů nebyla vztažena k inhibici cholinesteras. U nejlepšího inhibitoru lidské AChE z řady testovaných látek (**8**) byl zjištěn potenciál inhibovat také mAChR (IC<sub>50</sub> 37 μM) a nAChR (IC<sub>50</sub> 30 μM) (50). Podobná data jsou k dispozici pro látky **6-10**, které by mohly také fungovat jako antagonisté receptorů (50). Z těchto důvodů by nově připravené sloučeniny (např. **8**, **20**) měly být podrobeny dalšímu testování *in vivo*, aby se potvrdil nebo vyvrátil jejich *in vitro* potenciál pro profylaktickou terapii při intoxikaci OP/NPL (37).

## 6. ZÁVĚR

Bylo připraveno 20 potenciálních modulátorů cholinesteras a cholinergních receptorů. Výsledky testů ukázaly slibnou inhibiční schopnost některých sloučenin (8, 10, 12, 20). Tyto molekuly projevily lepší inhibiční vlastnosti než použité standardy (obidoxim, pralidoxim, BW284c51, ethopropazin). Čtyři sloučeniny byly vybrány pro následné studie molekulárního modelování, které potvrdily významné interakce s molekulami cholinesteras. Vybrané sloučeniny byly dále doporučeny pro testování *in vivo* za účelem profylaxe intoxikací OP/NPL.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Lincová, D.; Farghali, H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén: Praha, 2007.
- (2) Changeux, J. P.; Edelstein, S. J. *Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Odile Jakob: New York, 2005.
- (3) Le Novère, N.; Corringer, P.-J.; Changeux, J.-P. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *Neurobiol.* **2002**, *53*, 447–456.
- (4) Court, J.; Martin-Ruiz, C.; Graham A.; Perry E. Nicotinic receptors in human brain: topography and pathology. *J. Chem. Neuroanat.* **2000**, *20*, 281–298.
- (5) Lullmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie*. Grada: Praha, 2004.
- (6) Scarpero, H.; Dmochowski, R. Muscarinic receptors: what we know. *Curr. Urol. Rep.* **2003**, *4*, 421–428.
- (7) Aldrige, W. Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing *p*-nitrophenylacetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.* **1953**, *53*, 110–124.
- (8) Bajgar, J.; Fusek, J.; Kassa, J.; Jun, D.; Kuca, K.; Hajek, P. An attempt to assess functionally minimal acetylcholinesterase activity necessary for survival of rats intoxicated with nerve agents. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *175*, 281–285.
- (9) GILES, K. *Weizmann Institute of Science: Sussman/Silman Group Research Projects* [online]. 2004 [cit. 2011-11-13]. Cholinesterases. Dostupné z: <http://www.weizmann.ac.il/home/joel/projects/che.html>.

- (10) Nachon, F.; Masson, P.; Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Fontecilla-Camps, J. C. Comparison of structures of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. In *Butyrylcholinesterase: its function and inhibitors*. Giacobini, E., Ed.; Martin Dunitz: London, 2003.
- (11) Silman, I.; Sussman, J. L. Structural studies on acetylcholinesterase. In *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*. Giacobini, E., Ed.; Martin Dunitz: London, 2000.
- (12) Soreq, H.; Gnatt, A.; Loewenstein, Z.; Seville, L. F. Excavations into the active-site gorge of cholinesterases. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 353–358.
- (13) Kua, J.; Zhang, Y.; Eslami, A. C.; Butler, J. R.; McCammon, J. A. Studying the roles of W86, E202, and Y337 in binding of acetylcholine to acetylcholinesterase using a combined molecular dynamics and multiple docking approach. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 2675–2684.
- (14) Stojan, J.; Brochier, L.; Alies, C.; Colletier, J. P.; Fournier, D. Inhibition of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase by high concentrations of substrate. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 1364–1371.
- (15) Allderdice, P. W.; Garner, H. A. R.; Galutira, D.; Lockridge, O.; LaDu, B. N.; McAlpines, J. The cloned butyrylcholinesterase (BChE) gene maps to a single chromosome site. *Genomics* **1991**, *11*, 452–454.
- (16) Jun, D.; Musilova, L.; Kuca, K.; Kassa, J.; Bajgar, J. Potency of several oximes to reactivate human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon in vitro. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *175*, 421–424.
- (17) Main, A.; Soucie, W.; Buton I.; Princ, E. The purification of cholinesterase from horse serum. *Biochem. J.* **1974**, *143*, 733–744.
- (18) Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 131–138.

- (19) Jokanovic, M.; Stojiljkovic, M. P. Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *553*, 10–17.
- (20) Kellar, K. J. Overcoming inhibitions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 13263–13264.
- (21) Bajgar, J.; Fusek, J.; Kassa, J.; Kuca, K.; Jun, D. Chemical aspects of pharmacological prophylaxis against nerve agent poisoning. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2977–2986.
- (22) Amitai, G.; Moorad, D.; Adani, R.; Doktor, B. P. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 293–299.
- (23) Eyer, P. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol. Rev.* **2003**, *22*, 165–190.
- (24) Bajgar, J. Nervově paralytické látky. In Prymula, R., Ed.; *Biologický a chemický terorismus*. Grada: Praha, 2002.
- (25) Antonijevic, B.; Stojiljkovic, M. P. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *Clin. Med. Res.* **2007**, *1*, 71–82.
- (26) Patočka J. et al. *Vojenská toxikologie*. Grada: Praha, 2004.
- (27) Patočka, J.; Kuča, K.; Jun, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Kralové)* **2004**, *47*, 215–228.
- (28) Sungur, M.; Guven, M. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Crit. Care.* **2001**, *5*, 211–215.
- (29) Kamanyire, R.; Karalliedde, L. Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occup. Med.* **2004**, *54*, 69–75.

- (30) Senanayake, N.; Karalliedde, L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides: an intermediate syndrome. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *316*, 761–763.
- (31) Musilek, K.; Holas, O.; Misik, J.; Pohanka, M.; Novotny, L.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Kuca, K. Monooxime-monocarbamoyl bispyridinium xylene linked reactivators – synthesis, in vitro and toxicity evaluation, docking studies. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 247–254.
- (32) Johnson, M. K. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. *Biochem. J.* **1969**, *14*, 711–717.
- (33) Doctor, B. P.; Maxwell, D. M.; Saxena, A. Preparation and characterization of bioscavengers for possible use against organophosphate toxicity. *Book of Abstracts of the First Mini-Chemical and Biological Medical Treatment Symposium (The m-CB MTS)*, 26–30 May 1997, Hradec Kralove, pp. 17–18.
- (34) Huang, Y.-J.; Huang, Y.; Baldassarre, H.; Wang, B.; Lazaris, A.; Leduc, M.; Bilodeau, A. S.; Bellemare, A.; Cote, M.; Herskovits, P.; Touati, M.; Turcotte, C.; Valeanu, L.; Lemée, N.; Wilgus, H.; Bégin, I.; Bhatia, B.; Rao, K.; Neveu, N.; Brochu, E.; Pierson, J.; Hockley, D. K.; Cerasoli, D. M.; Lenz, D. E.; Karatzas, C. N.; Lagermann, S. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 13603–13608.
- (35) Koelle, G.B. Protection of cholinesterase against irreversible inactivation by DFP in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1946**, *88*, 323–327.
- (36) Fusek, J.; Bajgar, J.; Merka, V. Prophylaxe von Vergiftungen mit Nervenkampfstoffen: Ergebnisse einer klinischen Studie. *Koord. Sanitatsdienst* **2006**, *24*, 48–53.

- (37) Musilek, K.; Roder, J.; Komloova, M.; Holas, O.; Hrabínová, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Opletalová, V.; Kuca, K.; Jung, J.-S. Preparation, in vitro screening and molecular modelling of symmetrical 4-*tert*-butylpyridinium cholinesterase inhibitors – Analogues of SAD-128. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 150–154.
- (38) Gordon, R. K.; Haigh, J. R.; Garcia, G. E.; Feaster, S. R.; Riel, M.A.; Lenz, D.E. Oral administration of pyridostigmine bromide and huperzine A protects human whole blood cholinesterases from ex vivo exposure to soman. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *157*, 239–246.
- (39) ACD/PhysChem Suite, version 12.0.2 [online]. © Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto ON, Canada [cit. 2011-11-13]. Dostupné z [http://www.acdlabs.com/products/pc\\_admet/physchem/physchemsuite/](http://www.acdlabs.com/products/pc_admet/physchem/physchemsuite/)
- (40) Musilek, K.; Komloova, M.; Zavadová, V.; Holas, O.; Hrabínová, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K.; Jung, Y. S. Preparation and in vitro screening of symmetrical bispyridinium cholinesterase inhibitors bearing different connecting linkage – initial study for Myasthenia gravis implications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1763–1766.
- (41) Žďárová Karasová, J.; Kuča, K.; Jun, D.; Bajgar, J. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivity cholinesteras při *in vivo* hodnocení účinků reaktivátorů. *Chem. Listy.* **2010**, *104*, 46–50.
- (42) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.

- (43) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera – A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- (44) PyMOL: Molecular Visualization System [online]. © Schrödinger, LLC [cit. 2011-11-13]. Dostupné z <http://www.pymol.org/>
- (45) Protein Data Bank RCSB PDB [online]. © RCSB Protein Data Bank [cit. 2011-11-13]. Dostupné z <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>
- (46) Musilek, K.; Pavlikova, R.; Marek, J.; Komloova, M.; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. The preparation, in vitro screening and molecular docking of symmetrical bisquaternary cholinesterase inhibitors containing a but-(2*E*)-en-1,4-diyl connecting linkage. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 245–253.
- (47) Ma, J. C.; Dougherty, D. A. The cation- $\pi$  interaction. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303–1324.
- (48) Musilek, K.; Komloova, M.; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K. Preparation and in vitro screening of symmetrical bis-isoquinolinium cholinesterase inhibitors bearing various connecting linkage – implications for early Myasthenia gravis treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 811–818.
- (49) Umezawa, Y.; Tsuboyama, S.; Takahashi, H.; Uzawa, J.; Nishio, M. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 10047.
- (50) Broomfield, C.; Dembure, I. J.; Cuculis, J. Binding of soman antidotes to acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 1017–1022.
- (51) Layish, I.; Krivoy, A.; Rotman, E.; Finkelstein, A.; Tashma, Z.; Yehezkelli, Y. Pharmacologic prophylaxis against nerve agent poisoning. *Isr. Med. Assoc. J.* **2005**; *7*, 182–187.

