

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

**PŘÍPRAVA A *IN VITRO* SCREENING KVARTERNÍCH
INHIBITORŮ ACETYLCHOLINESTERASY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

„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.“

Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001.

Hradec Králové, 2011

Ondřej Benek

Děkuji doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. a PharmDr. Kamilu Musílkovi, Ph.D. za pomoc při zpracování této diplomové práce.

Obsah

Seznam zkratk	6
Abstrakt	7
1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Cholinesterasy	10
2.1.1 Acetylcholin	10
2.1.2 Acetylcholinové receptory	10
2.1.3 Acetylcholinesterasa	12
2.1.4 Butyrylcholinesterasa	14
2.2 Inhibice acetylcholinesterasy	14
2.2.1 Mechanismus inhibice	15
2.2.2 Reversibilní karbamátové inhibitory	16
2.2.3 Ostatní reverzibilní inhibitory	17
2.3 Ireverzibilní organofosforové inhibitory	17
2.3.1 Struktura OF	18
2.3.2 Mechanismus účinku	19
2.3.3 Biotransformace OF	20
2.4 Otrava OF	20
2.4.1 Vstup do organismu	20
2.4.2 Klinický obraz otravy	21
2.4.3 Terapie otravy	22
2.5 Reaktivátory AChE	23
2.5.1 Struktura	23
2.5.2 Mechanismus účinku	24
2.6 Profylaxe otravy OF	24
2.6.1 Reverzibilní inhibitory AChE	25
2.6.2 Scavengery	26
2.6.3 Další metody	26

3	Syntetická část.....	27
3.1	Obecná syntetická část.....	27
3.2	Příprava.....	27
4	Stanovení inhibičních parametrů.....	48
4.1	Princip metody	48
4.2	Postup měření	48
4.3	Výsledky měření.....	50
5	Diskuse.....	51
6	Závěr	54
7	Použitá literatura	55

Seznam zkratek

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
Asp	kyselina asparagová
BChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervový systém
DMSO	dimethylsulfoxid
EtOAc	ethyl-acetát
GIT	gastrointestinální trakt
Glu	kyselina glutamová
HEB	hematoencefalická bariéra
His	histidin
AChEI	inhibitor acetylcholinesterasy
mAChR	muskarinový receptor pro acetylcholin
MeCN	acetonitril
nAChR	nikotinový receptor pro acetylcholin
NPL	nervově paralytické látky
OF	organofosforová sloučenina
Ser	serin
Trp	tryptofan

Příprava a *in vitro* screening kvarterních inhibitorů acetylcholinesterasy

Abstrakt

Reversibilní inhibitory acetylcholinesterasy (AChE) našly široké uplatnění v lidské farmakoterapii. Jednou z oblastí jejich využití je profylaxe otravy organofosforovými sloučeninami (OF). K tomuto účelu jsou v současné době používány karbamátové inhibitory (např. pyridostigmin-chlorid). Karbamátový inhibitor se naváže na aktivní místo enzymu, a tím ho ochrání před ireversibilní inhibicí způsobenou OF. Vzhledem k mnoha nežádoucím účinkům těchto látek je snaha nalézt mezi inhibitory AChE vhodnější alternativu.

V rámci této diplomové práce bylo připraveno 19 potenciálních inhibitorů AChE a *in vitro* byla stanovena jejich účinnost vůči AChE a butyrylcholinesterase. Výsledky byly porovnány se selektivními standardními inhibitory cholinesteras BW284c51 a ethopropazinem. Žádná z připravených sloučenin nevykázala vyšší účinnost nebo selektivitu než použité standardy. Na základě získaných dat byly stanoveny vztahy mezi strukturou a účinkem připravených sloučenin.

Preparation and *in vitro* screening of quaternary inhibitors of acetylcholinesterase

Abstract

Reversible acetylcholinesterase (AChE) inhibitors are extensively used in human medicine. Among other applications they are used as a pre-exposure treatment for the prevention of organophosphorus poisoning. For this purpose carbamate inhibitors are recently used (e.g. pyridostigmine chloride). Carbamates reversibly block AChE active site and thus protect AChE against irreversible inhibition by organophosphorus compounds. However, these drugs have many undesirable side-effects and thus there are efforts to find a more suitable alternative among reversible AChE inhibitors.

In this diploma thesis, 19 potential AChE inhibitors were prepared. Their ability to inhibit AChE and butyrylcholinesterase was evaluated *in vitro* and compared to selective standard cholinesterase inhibitors BW284c51 and etho-

propazine. None of the prepared compounds was superior to used standards in inhibitory ability or selectivity. The structure activity relationship of the novel compounds was determined from the obtained data.

1 Úvod

Organofosforové sloučeniny (OF) jsou uměle připravené, vysoce toxické látky. První sloučeniny byly syntetizovány v druhé polovině 19. století ve Francii. V první polovině 20. století bylo připraveno velké množství OF pro použití v zemědělství jako pesticidy. Vzhledem k jejich vysoké toxicitě a snadnému průniku do organismu našly některé deriváty uplatnění ve vojenství jako chemické zbraně, tzv. nervově paralytické látky (NPL) [23].

OF působí na organismus mechanismem inhibice enzymu acetylcholinesterasy (AChE). Inhibovaná AChE pak nemůže plnit svou fyziologickou funkci, totiž hydrolyzovat neurotransmitter acetylcholin (ACh). Důsledkem je hromadění ACh na synapsi a rozvoj cholinergní krize, která může vést až k úmrtí na selhání dechových funkcí [26].

Současně s vývojem NPL se začalo pracovat na metodách terapie a profylaxe otravy OF. Terapie je dnes založena na podání kombinace reaktivátor, anticholinergikum a antikonvulzivum. K profylaxi otravy OF je v současné době schválena pouze jediná látka, reversibilní karbamátový inhibitor acetylcholinesterasy (AChEI) pyridostigmin-chlorid. Používán je většinou v kombinaci s centrálně působícím anticholinergikem (např. benaktyzin, trihexyfenidyl) [24, 25].

Preventivní aplikace pyridostigminu zvyšuje šanci na přežití a zlepšuje účinnost vlastní poexpoziční terapie. Vzhledem k jeho častým nežádoucím účinkům je však snaha nalézt nové sloučeniny, které by byly lépe snášeny. Mezi perspektivní látky patří mimo jiné selektivní AChEI [24].

Cílem této diplomové práce je příprava kvarterních inhibitorů AChE a *in vitro* testování jejich účinnosti. Součástí práce je též literární rešerše dané problematiky.

Diplomová práce je součástí výzkumného úkolu řešeného za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (č. 117909/2009/B-CH/FaF), Ministerstva obrany ČR (č. OVUOFVZ200805) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (č. SVV-2010-261-001).

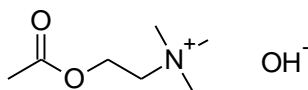
2 Teoretická část

2.1 Cholinesterasy

Jako cholinesterasy označujeme skupinu enzymů, které hydrolyzují přednostně estery cholinu. Tyto enzymy řadíme do skupiny serinových hydro-las, kam patří spolu s dalšími proteasami, např. trypsinem. V lidském těle se vyskytují dva typy cholinesteras, acetylcholinesterasa (AChE; EC 3.1.1.7) a bu-tyrylcholinesterasa (BChE; EC 3.1.1.8) [1].

2.1.1 Acetylcholin

Acetylcholin (ACh; obr. 1) je neurotransmitter vyskytující se v centrálním i periferním nervovém systému. Je hlavním neurotransmiterem ve vegetativních gangliích, postgangliových vláknech parasymptiku a na nervosvalové plotén-ce. Syntetizován je v cytoplazmě neuronů z bazického alkoholu cholinu a ace-tyl-koenzymu A pomocí enzymu cholinacetyltransferasy. Po uvolnění z axonu do synaptické štěrbiny se ACh váže na příslušné receptory. Jeho působení na synapsi je rychle ukončeno enzymatickou hydrolýzou pomocí AChE [2].



Obrázek 1 Struktura acetylcholinu.

2.1.2 Acetylcholinové receptory

Rozlišujeme dva hlavní typy acetylcholinových receptorů, nikotinové (nAChR) a muskarinové (mAChR). Označení vzniklo podle jejich specifických agonistů, přírodních alkaloidů nikotinu a muskarinu.

Nikotinové receptory se nacházejí v centrálním nervovém systému (CNS), vegetativních gangliích a na nervosvalové ploténce. Jsou spřaženy s iontovým kanálem a zprostředkovávají rychlou excitační odpověď na ACh.

Muskarinové receptory se nacházejí na postsynaptických membránách buněk orgánů inervovaných parasymptikem a v CNS. Jsou spřaženy s G-proteinem a zprostředkovávají pomalou excitační i inhibiční odpověď na ACh [3].

2.1.2.1 Nikotinové receptory

Nikotinové receptory jsou ligandem řízené iontové kanály. Vlastní receptor je tvořen pěti podjednotkami: dvěma α , jednou β , δ a γ nebo ϵ (v závislosti na stupni vývoje). Ty společně vytvářejí pentamerní strukturu obklopující transmembránový pór, který je specificky propustný pro sodné, draselné a vápenaté ionty [4]. Po navázání ligandu dojde ke změně konformace a otevření kanálu. Vazebné místo pro ACh je lokalizované na extracelulární části α podjednotek. Jeden receptor tak má dvě domény pro navázání ACh [5]. U člověka rozlišujeme dva podtypy nAChR, muskulární a neuronální, lišící se svou strukturou a lokalizací v těle [2].

Muskulární nAChR zprostředkovávají přenos signálu mezi neurony a svalovými buňkami. Jsou tvořeny dvěma α_1 podjednotkami, jednou β_1 , γ , δ a případně ϵ [4].

Neuronální nAChR zprostředkovávají přenos signálu mezi neurony ve vegetativních gangliích a CNS. Složeny jsou z α a β podjednotek různých typů podle jejich aktuální exprese. Ta se mění během vývoje a stárnutí organismu a také při onemocněních jako jsou autismus, schizofrenie, Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba [6].

2.1.2.2 Muskarinové receptory

Strukturně jsou mAChR glykoproteiny se sedmi transmembránovými doménami, podobně jako ostatní receptory spřažené s G-proteinem. U člověka rozlišujeme pět podtypů mAChR (M_1 až M_5). M_1 , M_3 a M_5 podtypy zajišťují excitační odpověď na ACh. Podtypy M_2 a M_4 zajišťují naopak odpověď inhibiční. Všechny pět podtypů můžeme nalézt v CNS, nejvíce zastoupený je zde však podtyp M_1 . Muskarinové receptory v CNS přenášejí signály pro řízení motorických funkcí, regulaci tělesné teploty a kardiovaskulárního systému a signály ovlivňu-

jící paměť. M_1 podtyp se dále vyskytuje v parietálních buňkách žaludku, kde jeho aktivace vede ke zvýšení žaludeční sekrece. V srdci se nachází M_2 podtyp, jeho aktivace vede k útlumu srdeční činnosti. Vyskytuje se též na presynaptické membráně, kde zajišťuje negativní zpětnou vazbu na ACh. M_3 podtyp se nachází v hladké svalovině viscerálních orgánů a v exokrinních žlázách. Jeho aktivace vede ke kontrakci hladkých svalů a zvýšení exokrinní sekrece. Funkce podtypů M_4 a M_5 zatím není dostatečně prozkoumána [2, 7].

2.1.3 Acetylcholinesterasa

Acetylcholinesterasa je membránově vázaný enzym, katalyzující hydrolyzu esterů s relativní specifitou k neurotransmitteru acetylcholinu. V lidském těle se nachází v nervových zakončeních, erytrocytech, plicích, bránici a všech částech mozku. Její hlavní funkcí je rychlé ukončení účinku ACh na cholinergní synapsi [8].

2.1.3.1 Struktura molekuly

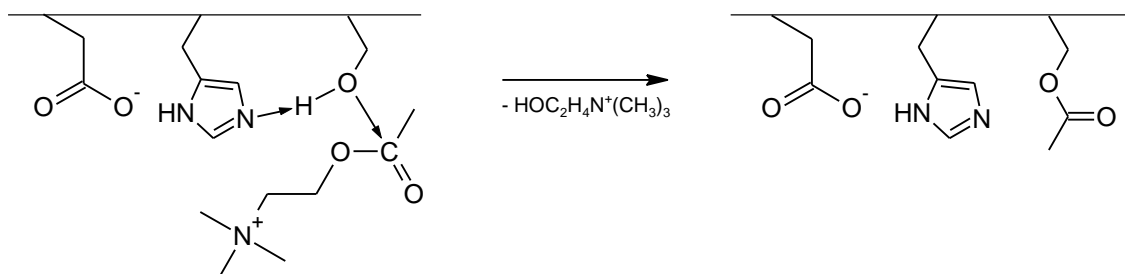
Monomer AChE je glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 60 000. Skládá se z 12 β -skládaných listů a 14 α -helixů. Celá molekula je dnes poměrně přesně zmapována. Nachází se na ní tři základní domény důležité pro vlastní funkci enzymu: aktivní místo, aromatická štěrbina a vnější anionické místo [9].

Aktivní místo enzymu je složeno ze dvou podjednotek, esteratické a anionické [9]. Esteratickou podjednotku tvoří tzv. katalytická triáda, složená z aminokyselin serinu (Ser203), histidinu (His447) a glutaminu (Glu334). Podobná katalytická triáda je společná i dalším serinovým hydrolasam. Anionické místo je tvořeno aminokyselinami s aromatickým postranním řetězcem. Klíčovou aminokyselinou anionického místa je tryptofan (Trp86), interagující svým aromatickým zbytkem s kladně nabitou částí molekuly substrátu. Interakce této podjednotky s trimethylamoniovou skupinou ACh je zásadní pro správnou orientaci substrátu vůči aktivnímu místu [9, 10].

Na 3D modelu enzymu je patrné, že aktivní místo leží na dně asi 20 Å hluboké prohlubně označované jako aromatická štěrbina. Při jejím ústí se nachází vnější anionické místo [11]. Zásadní význam pro jeho funkci mají aminokyseliny asparagin (Asp74) a tryptofan (Trp286) [12].

2.1.3.2 Hydrolyza acetylcholinu

Hydrolyza ACh probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku (obr. 2) je elektrofilní karbonylový uhlík ACh napaden nukleofilní OH-skupinou serinu katalytické triády. Nukleofilní atak je podpořen imidazolovým dusíkem histidinu katalytické triády, který s OH-skupinou serinu vytváří vodíkový můstek. Vzniká kovalentní vazba mezi acylem a serinovým hydroxylem. Uvolněný cholin je vychytáván na presynaptické membráně a využit k syntéze nového ACh v nervovém zakončení. V druhém kroku acetylovaný enzym spontánně hydrolyzuje za vzniku kyseliny octové a dochází k uvolnění aktivního místa [13]. Regenerace AChE je velice rychlá, jedním aktivním místem je za vteřinu hydrolyzováno více jak 10 000 molekul ACh [2].



Obrázek 2 První krok hydrolyzy ACh.

2.1.3.3 Substrátová inhibice

AChE je na rozdíl od BChE inhibována nadbytkem substrátu. ACh se váže na vnější anionické místo při ústí aromatické štěrbiny a inhibuje činnost enzymu [14]. Není přesně známo, zda má tato regulace nějakou biologickou funkci. Některé studie naznačují, že primární funkcí vnějšího anionického místa je urychlení hydrolyzy při nízkých koncentracích substrátu [15]. Na vnější anionické místo se váží také některé nekompetitivní AChEI (např. propidium-dibromid, fascikulin). Vlastní mechanismus inhibice je založen na kombinaci dvou efektů,

sterickém omezení průchodu substrátu skrze aromatickou štěrbinu a alosterickým ovlivnění poměrů v aktivním místě enzymu [16].

2.1.4 Butyrylcholinesterasa

Tento enzym je znám též pod označeními nescifická cholinesterasa, sérová cholinesterasa nebo pseudocholinesterasa. BChE je ve srovnání s AChE méně substrátově specifická. Rozkládá přednostně jiné substráty než ACh (např. butyrylcholin, kokain, suxamethonium-chlorid nebo některá lokální anestetika). Nachází se především v plazmě, ale nalézt ji můžeme i v játrech, střevech, slinivce, hladkém svalstvu a bílé hmotě mozku [2].

Přesná funkce BChE v těle není dodnes známa. Předpokládá se, že hraje roli v metabolismu lipoproteinů [17], při vzniku amyloidového prekurzorového proteinu [18], jako scavenger toxických molekul nebo při metabolizaci některých exogenních látek, např. léčiv [19]. Její aktivita se zvyšuje s věkem, zvýšená je u pacientů s Alzheimerovou chorobou. BChE se nachází též v senilních placích [20].

BChE (stejně jako AChE) je inhibována organofosforovými sloučeninami (OF). Snížená aktivita BChE v plazmě tak může sloužit jako indikátor otravy [21]. Podání exogenní BChE do organismu je zkoušeno jako potenciální metoda profylaxe otravy OF [22].

2.2 Inhibice acetylcholinesterasy

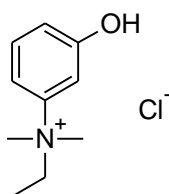
Inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI) působí na organismus nepřímým parasymptomimetickým a nepřímým cholinomimetickým efektem. Inhibicí acetylcholinesterasy dochází k hromadění jejího substrátu ACh na všech cholinergních synapsích, tj. na efektorech parasymptiku (mAChR), ve vegetativních gangliích (neuronální nAChR) a na nervosvalové ploténce (muskulární nAChR).

Podle chemické struktury lze AChEI rozdělit na tři skupiny:

- jednoduché primární alkoholy s kvarterním dusíkem (např. edrofonium-chlorid; obr. 3) a další nekovalentně se vážící inhibitory

- estery kyseliny karbamové, tzv. karbamáty (např. fysostigmin, neostigmin-bromid; obr. 4)
- organické sloučeniny kyseliny fosforečné a fosfonové, tzv. organofosfáty (např. paraoxon, parathion; obr. 7)

Podle délky trvání účinku se AChEI dělí na reversibilní (karbamáty a nekovalentně se vážící inhibitory) a ireversibilní (organofosfáty) [2].



Obrázek 3 Edrofonium-chlorid.

2.2.1 Mechanismus inhibice

Reversibilní AChEI s výjimkou karbamátů se váží na AChE nekovalentní vazbou [2]. Interagují buď s anionickou podjednotkou aktivního místa (kompetitivní inhibitory; např. edrofonium-chlorid), nebo s periferním anionickým místem (nekompetitivní inhibitory; viz kapitola 2.1.3.3) [24].

Karbamáty a OF se váží kovalentní vazbou na serinový hydroxyl aktivního místa AChE. Délka jejich účinku závisí na rychlosti spontánní hydrolýzy této vazby [2].

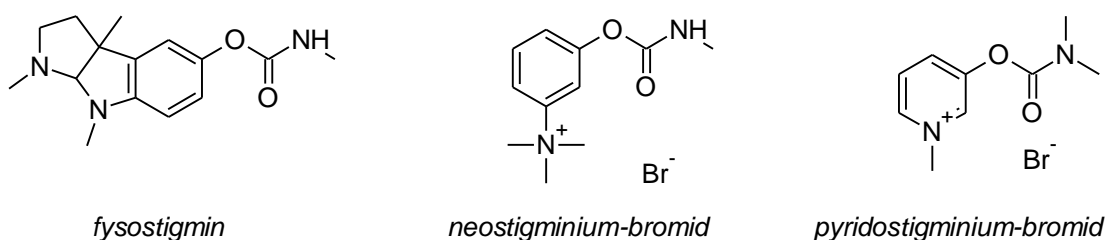
Estery kyseliny karbamové jsou podobně jako ACh substrátem AChE. I u nich dochází po navázání na enzym k dvoustupňové hydrolýze. Karbamoylovaný enzym je však vůči hydrolýze mnohem odolnější než enzym acetylovaný. Délka účinku se tak pohybuje v závislosti na použité látce od 30 minut do 6 hodin.

Organofosforové sloučeniny (OF) reagují pouze s esteratickou podjednotkou aktivního místa. Charakteristická je pro ně nízká specifita pro AChE, reagují i s dalšími serinovými hydrolasami, např. trypsinem, trombinem. Kovalentní vazba na serinový hydroxyl je extrémně stabilní a hydrolyzuje velice pomalu (stovky hodin) nebo vůbec. Inhibice OF je tedy ireverzibilní. Komplex fos-

forylovaného enzymu navíc takzvaně „stárne“, čímž se vazba na enzym dále zesiluje [2].

2.2.2 Reversibilní karbamátové inhibitory

Jsou to estery kyseliny karbamové obsahující ve své molekule terciární nebo kvarterní dusík. Svou strukturou se alespoň vzdáleně podobají acetylcholinu. Mezi tyto sloučeniny patří např. fysostigmin, neostigmin-bromid, pyridostigmin-bromid (obr. 4) [2].

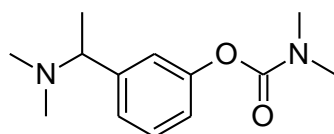


Obrázek 4 Vybrané karbamátové AChEI.

Tyto sloučeniny našly poměrně široké využití v humánní a veterinární medicíně a jako pesticidy v zemědělství [23]. Reversibilní karbamátové AChEI se uplatňují při léčbě glaukomu, léčbě a prevenci pooperačních atonií GIT a močových cest a jako antidota periferních myorelaxancií.

K terapii Myasthenia gravis se používají karbamáty obsahující ve své molekule kvarterní dusík. Díky tomu neprocházejí skrze hematoencefalickou bariéru (HEB), a postrádají tak nežádoucí centrální účinky. Navíc jsou některé z těchto látek přímými agonisty nikotinových receptorů (zejména muskulárních), a mají tedy zesílený účinek na nervosvalové ploténce (např. neostigmin-bromid).

K terapii Alzheimerovy choroby se naopak používají látky s terciárním dusíkem procházející HEB (např. rivastigmin; obr. 5) [2].

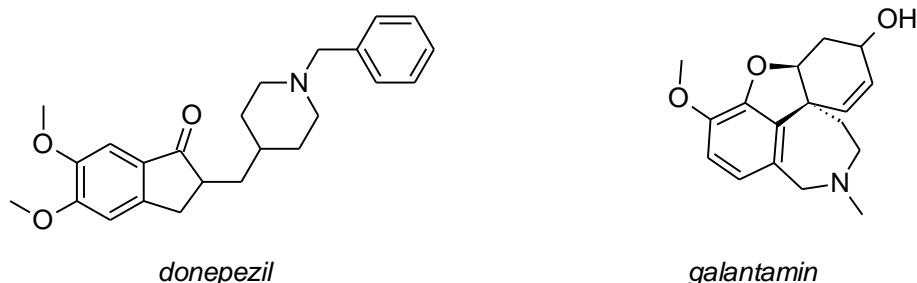


Obrázek 5 Struktura rivastigminu.

V neposlední řadě se reversibilní AChEI (pyridostigmin-chlorid) používají k profylaxi otravy OF (viz kapitola 2.6) [24].

2.2.3 Ostatní reverzibilní inhibitory

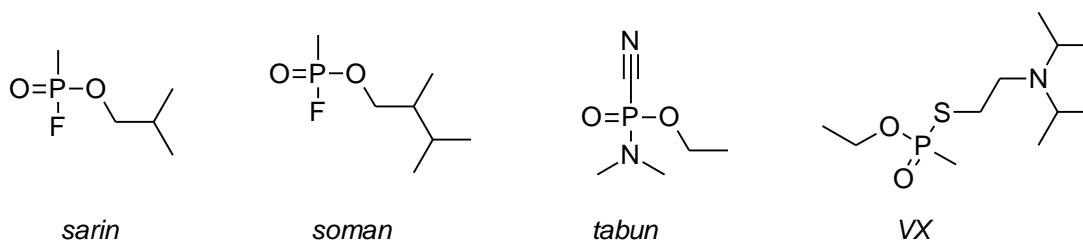
Strukturně jde o rozmanitou skupinu látek obsahujících ve své molekule atom dusíku. Nekovalentně se vážící inhibitory našly uplatnění při léčbě Alzheimerovy choroby (např. donepezil, galantamin; obr. 6) [27]. Testovány jsou jako potenciální léčiva k profylaxi otravy OF (např. huperzin A; viz kapitola 2.6.1) [41].



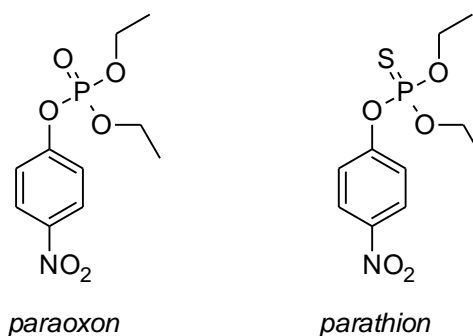
Obrázek 6 Vybraná léčiva Alzheimerovy choroby.

2.3 Ireverzibilní organofosforové inhibitory

Některé organické sloučeniny fosforu působí jako ireverzibilní inhibitory AChE. Na rozdíl od reverzibilních AChEI nenašly téměř žádné uplatnění v medicíně, zato ale mají velký význam toxikologický. Pro svou vysokou toxicitu, rychlý nástup účinku a snadný vstup do organismu se používají jako bojové chemické látky, tzv. nervově paralytické látky (např. sarin, soman, tabun, VX; obr. 7) Široké využití mají také jako insekticidy v zemědělství (např. paraoxon, parathion; obr. 8) [25].



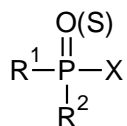
Obrázek 7 Vybrané nervově paralytické látky.



Obrázek 8 Vybrané organofosforové insekticidy.

2.3.1 Struktura OF

Chemická struktura OF je nejčastěji odvozena od kyseliny fosforečné, fosfonové nebo jejich thioanalogů. Vystihuje ji obecný Schraderův vzorec pro OF (obr. 9). Zbytky R^1 a R^2 mohou být vodík, alkyl, cykloalkyl, aryl, alkyloxy, alkylthio a amino skupiny. Substituent X může být halogen, kyano, alkylthio, fenoxi skupina nebo zbytek organické či anorganické kyseliny [26].



Obrázek 9 Schraderův vzorec.

Vztah mezi strukturou a účinkem lze stručně shrnout do následujících bodů:

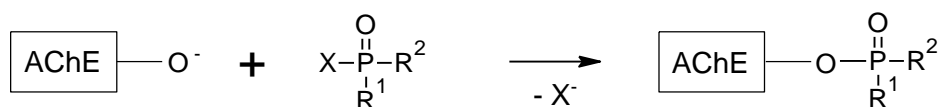
- estery kys. fosfonové bývají toxickejší než analogické estery kys. fosforečné
- sloučeniny s jednou vazbou P-N bývají toxickejší než sloučeniny se dvěma vazbami tohoto typu

- toxicita klesá v řadě F – I – CN
- oxosloučeniny jsou toxicitější než jejich thioanaloga [27]

2.3.2 Mechanismus účinku

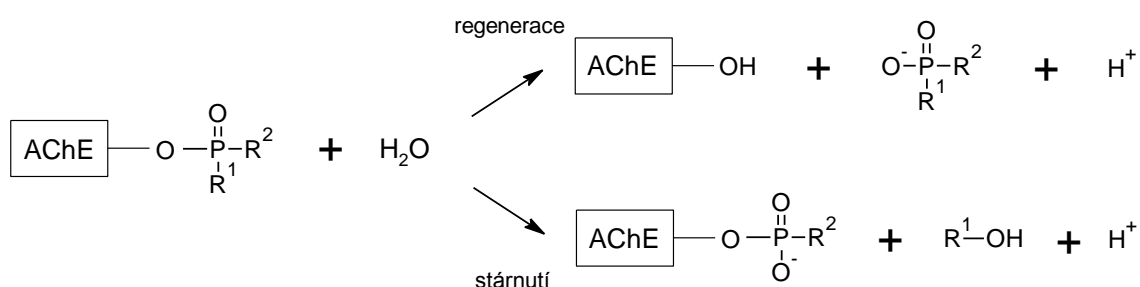
Organofosforové sloučeniny (OF) reagují pouze s esteratickou podjednotkou aktivního místa AChE. Molekula OF se kovalentně váže na serinový hydroxyl za odštěpení části své molekuly (odstupující skupina odpovídá substituentu X ve Schraderově vzorci; obr. 10). Vazba na enzym je extrémně stabilní a hydrolyzuje velice pomalu (stovky hodin; obr. 11) nebo vůbec. Inhibice OF je tedy ireverzibilní (spontánní hydrolyza probíhá pomaleji než syntéza enzymu *de novo* [2, 28]).

V této fázi lze ještě vazbu OF na enzym zvrátit pomocí silně nukleofilních látek, tzv. reaktivátorů AChE [2].



Obrázek 10 Reakce AChE s organofosforovou sloučeninou.

Vazba OF na enzym však podléhá další reakci, tzv. stárnutí (obr. 11). Při něm dochází k dealkoxylaci fosforylové části komplexu enzym – inhibitor. Poté již nelze enzym reaktivovat a vazba se stává definitivně ireverzibilní. Rychlost „stárnutí“ závisí na chemické struktuře OF. Nejrychleji probíhá u nervově paralytické látky (NPL) somanu, kde se poločas dealkylace pohybuje v řádu minut. Rychlost tohoto procesu tedy výrazně ovlivňuje efekt léčby při otravě OF [25].



Obrázek 11 Regenerace a stárnutí inhibované AChE.

2.3.3 Biotransformace OF

Během biotransformace jsou OF převáděny na hydrofilnější metabolity, které může organismus snáze eliminovat. Většinou zároveň dochází i ke snížení toxicity OF. Jsou však i výjimky, kdy vzniklý metabolit je toxičtější než původní látka (např. metabolizace parathionu na paraoxon).

Biotransformace OF probíhá dvoufázově. V první fázi dochází převážně k oxidačním reakcím. Na této fázi biotransformace se podílejí zejména enzymy z rodiny cytochromu P450, flavinmonooxygenasy a esterasy.

V druhé fázi biotransformace dochází ke konjugaci OF nebo jejich metabolitů s endogenními substráty (např. kys. glukuronová, sulfát, acetát, glycin, glutathion). Tyto reakce zprostředkovávají například enzymy glukuronyltransferasa, sulfotransferasa, acetyltransferasa nebo glutathiontransferasa [23].

2.4 Otrava OF

Riziko otravy OF hrozí například v zemědělství (pesticidy), ve válečných konfliktech (bojové chemické látky) nebo při jejich zneužití k teroristickému útoku. Poměrně časté je i jejich použití za účelem sebevraždy [29].

2.4.1 Vstup do organismu

OF jsou ve většině případů vysoce lipofilní látky, které se mohou do organismu dostat různými branami vstupu. Velmi snadno se vstřebávají z GIT, plic i skrze kůži. Na místo účinku jsou transportovány krevním oběhem. Zde dochází k poměrně velkým ztrátám, když OF reagují s BChE a dalšími enzymy, jejichž fosforylace nevyvolává žádné klinické příznaky. Na místo účinku se tak dostává pouze část přijaté dávky [25].

2.4.2 Klinický obraz otravy

Inhibice AChE vede k hromadění neurotransmiteru ACh ve všech cholinergních synapsích a rozvoji cholinergní krize. Klinickým důsledkem je soubor muskarinových, nikotinových a centrálních příznaků, označovaný jako akutní fáze intoxikace. Ta může skončit až úmrtím na zástavu dechu. Po akutní fázi se může objevit tzv. přechodný syndrom a následně se mohou rozvinout pozdní komplikace v podobě polyneuropatií [25].

2.4.2.1 Akutní fáze

Mezi muskarinové příznaky patří zvýšená sekrece žláz (salivace, slzení, pocení, zvýšená bronchiální sekrece), zvýšená gastrointestinální motilita (nevolnost, křeče, defekace, zvracení), bronchokonstrikce (dušnost), hypotenze, bradykardie, mióza a porucha akomodace oka (rozostřené vidění).

Mezi nikotinové příznaky patří svalové záškuby a třes přecházející do tonicko-klonických křečí, které mohou vyústit až v depolarizační blokádu a paralýzu kosterního svalstva. Paralýza dýchacích svalů je nejčastější příčinou úmrtí během akutní fáze.

Centrální účinky OF se zprvu projevují excitací (napětí, zmatenost, neklid, křeče) a následně útlumem CNS (kóma, deprese dechového a kardiovaskulárního centra) [30].

2.4.2.2 Přechodný syndrom

Přibližně 1 až 4 dny po prodělání akutní fáze intoxikace se může objevit tzv. přechodný syndrom. Projevuje se svalovou slabostí a obrnou hlavových nervů. Může dojít až k respiračnímu selhání doprovázenému obrnou dýchacích svalů. K uzdravení dochází po 4 až 21 dnech při intenzivní péči a umělé ventilaci. Přesná patogeneze přechodného syndromu není známa [31].

2.4.2.3 Opožděná polyneuropatie

Tento syndrom se může objevit během 7. – 21. dne po intoxikaci. Postihuje zejména dlouhé nervy periferního nervového systému a způsobuje symetrickou slabost distálních svalů rukou a nohou, v různé míře též poruchy senzoryckých funkcí v oblasti končetin. Podle míry poškození je tato dysfunkce buď trvalá, nebo dochází k různému stupni regenerace.

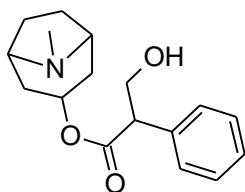
Patofyziologie procesů vedoucích k syndromu opožděné polyneuropatie není zcela přesně známa. Základem je pravděpodobně vazba OF na tzv. neurotoxickou esterasu, její inhibice a změna jejích vlastností [23, 32].

2.4.3 Terapie otravy

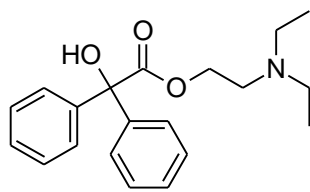
K terapii otravy OF se používají kombinace tří druhů léčiv s odlišným mechanismem účinku. Anticholinergika a antikonvulziva působí jako funkční (symptomatická) antidota, protože neodstraňují příčinu otravy, ale zmírňují její následky. Reaktivátory AChE jsou kauzální antidota otravy OF [25, 33].

2.4.3.1 Anticholinergika

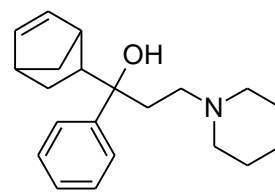
Váží se na cholinergní receptory a brání jejich nadměrné stimulaci nahromaděným ACh. Podávají se až do objevení prvních příznaků předávkování (mydriáza, zčervenání kůže, suchost sliznic, tachykardie). Nejčastěji používaným léčivem je atropin (obr. 12), selektivní antagonist muskarinových receptorů působící především periferně. Dále se používá např. benaktyzin nebo biperiden (obr. 11), které mají výraznější centrální účinky [25].



atropin



benaktyzin

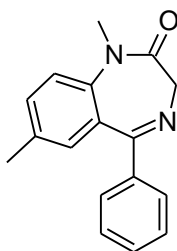


biperiden

Obrázek 12 Příklady používaných anticholinergik.

2.4.3.2 Antikonvulziva

Jako antikonvulziva se při otravě OF používají benzodiazepiny. Benzodiazepiny potencují účinek neurotransmiteru kys. γ -aminomáselné na jejích receptorech, a způsobují tak hyperpolarizaci membrán neuronů. Ty jsou pak méně citlivé k depolarizaci vyvolávané ACh [34]. Benzodiazepiny tak tlumí křeče a také snižují úzkost a neklid. Jejich podání společně s anticholinergiky a reaktivátory AChE snižuje mortalitu. Látkou první volby je diazepam (obr. 13) [35].



Obrázek 13 Struktura diazepamů.

2.5 Reaktivátory AChE

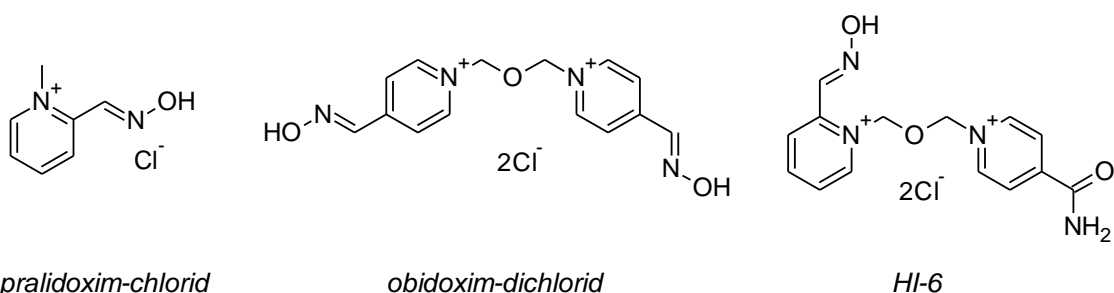
Reaktivátory AChE jsou kauzálními antidoty při otravě OF. Vytěsňují OF z vazby na AChE a umožňují návrat k normálnímu přenosu signálů na cholinergních synapsích. Přes intenzivní výzkum nebyl dosud objeven univerzální reaktivátor, který by byl schopen reaktivovat fosforylovanou AChE bez ohledu na chemickou strukturu použitého OF [25].

Léčba pomocí reaktivátorů AChE působí zejména proti periferním nikotinovým příznakům otravy (úprava neuromuskulární transmise). Její efekt na periferní muskarinové příznaky není tolik výrazný. Centrální příznaky léčba neovlivňuje téměř vůbec, protože reaktivátory dostatečně neprocházejí HEB [2].

2.5.1 Struktura

Základními strukturálními znaky jsou přítomnost kvarterního dusíku a silně nukleofilní oximové skupiny. V současnosti používané reaktivátory jsou mono- nebo bispyridiniové sloučeniny s oximovou skupinou v poloze 2 nebo 4 na pyri-

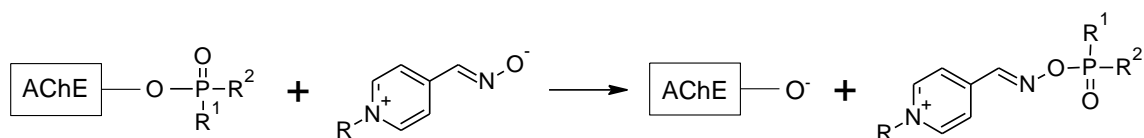
dinovém jádře (např. pralidoxim-chlorid, obidoxim-dichlorid, HI-6; obr. 14) [36, 37].



Obrázek 14 Příklady reaktivátorů.

2.5.2 Mechanismus účinku

Molekula reaktivátoru pomocí své kladně nabitě části interaguje s anionickou podjednotkou aktivního místa a orientuje oximovou skupinu do blízkosti fosforylovaného serinového hydroxyly. Nukleofilní oximová skupina pak napadá vazbu OF – enzym za vzniku fosforylovaného oximu a uvolnění regenerovaného enzymu (obr. 15) [38]. Fosforylovaný reaktivátor se sám stává silným inhibítorem, ale rychle se eliminuje nebo rozkládá na netoxické produkty [39].



Obrázek 15 Mechanismus reaktivace.

K reaktivaci enzymu však může dojít jen v případě, že komplex enzym – OF ještě nepodlehli tzv. „stárnutí“ (viz kapitola 2.3.2).

2.6 Profylaxe otravy OF

Některé pro člověka vysoce toxické OF jsou využívány jako chemické zbraně (např. sarin, soman, tabun, VX) [23]. Hrozí jejich použití ve válečných konfliktech nebo při teroristických útocích [25]. Současná poexpoziční terapie

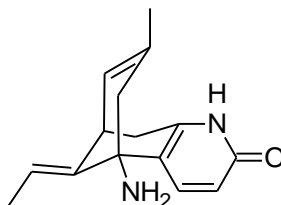
má určité limity, a je proto snaha nalézt léčiva, která by při preventivním podání byla schopna mírnit příznaky případné intoxikace [40].

2.6.1 Reverzibilní inhibitory AChE

Nejčastěji používaným léčivem v této indikaci je pyridostigmin-chlorid (je-
diná látka schválená FDA v této indikaci). Jeho profylaktické podání snižuje
mortalitu a zvyšuje účinnost poexpoziční terapie [24].

Pyridostigmin je kompetitivní reverzibilní karbamátový inhibitor AChE.
Váže se na aktivní místo AChE, tím inhibuje její funkci (viz kapitola 2.2.1), ale
zároveň chrání enzym před navázáním OF. Komplex pyridostigmin – enzym je
pak postupně hydrolyzován za uvolnění nativního enzymu, který může opět pl-
nit svou funkci. Pyridostigmin obsahuje v molekule kvarterní dusík, prochází
tedy pouze minimálně HEB, a proto nemůže ochránit AChE v mozku. Z tohoto
důvodu se většinou používá v kombinaci s centrálně působícím anticholiner-
giem (např. benaktyzin, trihexyfenydil) [24].

Profylaxe pyridostigminem však přináší i řadu nežádoucích účinků. Je
proto snaha nalézt mezi AChEI vhodnější alternativu [24]. Zkoušeny jsou látky
procházející HEB (např. huperzin A; obr. 16), které by mohly ochránit i AChE
v mozku [41]. Perspektivními látkami jsou též inhibitory se selektivním účinkem
vůči AChE. V případě selektivní inhibice AChE může volná BChE sloužit jako
endogenní scavenger OF. Předpokládá se tedy lepší účinnost takových látek při
menších nežádoucích účincích [24].



Obrázek 16 Struktura huperzinu A.

2.6.2 Scavengery

Jednou z perspektivních metod profylaxe je použití tzv. scavengerů, látek, které jsou schopny na sebe vázat OF a inaktivovat je dříve než stihnou poškodit organismus. Konkrétně se jedná o enzymy s afinitou k OF [42]. Podle typu interakce s OF se scavengery dělí na dvě skupiny, stechiometrické a katalytické.

Mezi stechiometrické scavengery patří např. AChE a BChE. Stechiometrické scavengery na sebe jednorázově naváží OF, a tím ji inaktivují, přičemž samy jsou také vyřazeny z funkce. Platí tedy, že 1 mol stechiometrického scavengeru inaktivuje 1 nebo 2 moly OF (podle počtu vazebných míst).

Katalytické scavengery jsou schopny opakovaně katalyzovat přeměnu OF na netoxické produkty. 1 mol katalytického scavengeru tedy může inaktivovat mnohonásobně větší množství OF. Mezi katalytické scavengery patří některé hydrolasy nebo anhydrasy (např. paraoxonasa-1, fosfotriesterasa) [43, 44].

2.6.3 Další metody

V české armádě se k profylaxi používá reaktivátor AChE HI-6 ve formě transdermální náplasti postupně uvolňující účinnou látku [45].

Potenciál k využití jako profylaxe otravy OF mají metody založené na genové terapii [40].

3 Syntetická část

3.1 Obecná syntetická část

Rozpouštědla [aceton, acetonitril (MeCN), ether, ethyl-acetát (EtOAc)] a chemikálie byly dodány od firem Fluka a Sigma-Aldrich (Česká republika) a použity bez dalšího přečištění. Reakce byly monitorovány pomocí TLC (DC - Alufolien Cellulose F 254, Merck, Německo) s použitím soustavy BuOH-CH₃COOH-H₂O 5:1:2 a detekovány Dragendorffovým činidlem. Teploty tání byly měřeny na bodotávku PHMK 05 (VEB Kombinat Nagema, Radebeul, Německo) a nejsou korigovány.

NMR spektra byla měřena na Varian Gemini 300 (¹H 300 MHz, ¹³C 75 MHz, Palo Alto CA, USA). Chemické posuny pro ¹H i ¹³C spektra jsou uvedeny v ppm (δ) v poměru k signálu rozpouštědla DMSO (δ 2.50 pro ¹H; δ 39.43 pro ¹³C). Signály jsou uvedeny jako s (singlet), d (dublet), t (triplet) a m (multiplet).

Elementární analýza byla provedena na přístroji EA 1110 CHNS instrument (CE Instruments, Milano, Italy).

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

3.2 Příprava

Terciární amin (1.0 g) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml) a následně byl přidán odpovídající alkyhalogenid v 50 % nadbytku. Reakční směs byla zahřívána při 60 – 70 °C po dobu 8 – 123 hodin. Následně byla ochlazená na laboratorní

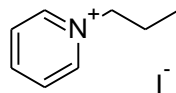
teplotu, byl k ní přidán nadbytek acetonu nebo etheru (80 ml) a byla ponechána přes noc v chladícím boxu (5 °C). Produkt byl odfiltrován za sníženého tlaku (krystalické látky) nebo dekantován s následným odlitím rozpouštědla (amorfní látky). Surový produkt byl rekrystalizován z EtOAc (50 ml) za varu.

Použité aminy: pyridin; *N,N*-dimethylanilin; *N,N*-dimethylbenzylamin; *N,N*-dimethyl-2-fenylethylamin

Použité alkylhalogenidy: propyljodid; allylbromid; benzylbromid; 2-fenylethyljodid (resp. - bromid); 3-fenylpropyljodid (resp. - bromid)

(1)

1-propylpyridinium-jodid



Doba reakce 17 h.

Výtěžek 71 %.

T.t. neměřeno (amorfní).

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 9.83-9.86 (d, 2H, H – 2, 6), 9.47-9.42 (m, 1H, H – 4), 9.40-9.35 (m, 2H, H – 3, 5), 8.29 (t, 2H, $J = 5.5$ Hz, N- CH_2), 4.30-4.27 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2), 3.34-3.31 (m, 3H, CH_3).

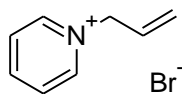
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 163.81, 154.28, 152.85, 123.04, 45.00.

ESI-MS: m/z 122.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}^+$] 122.19).

EA: neměřeno (amorfní).

(2)

1-(prop-2-en-1-yl)pyridinium-bromid



Doba reakce 31,5 h.

Výtěžek 99 %.

T.t. neměřeno (amorfní).

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 9.12 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H – 2, 6), 8.68-8.63 (m, 1H, H – 4), 8.20 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H – 3, 5), 6.22-6.13 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.46-5.39 (m, 2H, Pyr- CH_2), 5.34 (d, 2H, $J = 6.1$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}_2$).

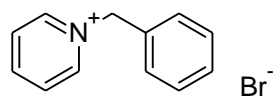
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 145.82, 144.72, 131.65, 128.15, 121.84, 62.18.

ESI-MS: m/z 120.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}^+$] 120.17).

EA: neměřeno (amorfní).

(3)

1-benzylpyridinium-bromid



Doba reakce 31,5 h.

Výtěžek 95 %.

T.t. neměřeno (amorfní).

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 9.29 (d, 2H, $J = 6.1$ Hz, H – 2, 6), 8.66-8.62 (m, 1H, H – 4), 8.20 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, H – 3, 5), 7.58-7.55 (m, 2H, Ph), 7.47-7.40 (m, 3H, Ph), 5.92 (s, 1H, CH_2).

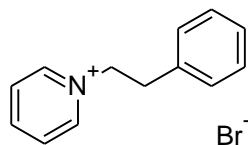
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 145.92, 144.74, 134.25, 129.28, 129.14, 128.74, 128.39, 63.01.

ESI-MS: m/z 170.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}^+$] 170.23).

EA: neměřeno (amorfní).

(4)

1-(2-fenylethyl)pyridinium-bromid



Doba reakce 31,5 h.

Výtěžek 88 %.

T.t. 124-125 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 9.06 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H – 2, 6), 8.63-8.55 (m, 1H, H – 4), 8.13 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, H – 3, 5), 7.34-7.18 (m, 5H, Ph), 4.90 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, N- CH_2), 3.28 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, N- CH_2 - CH_2).

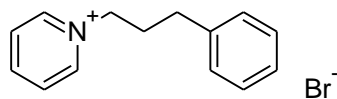
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 145.57, 144.67, 136.00, 128.78, 128.52, 127.79, 126.98, 61.31, 36.34.

ESI-MS: m/z 184.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}^+$] 184.26).

EA: vypočítáno 59.11 % C, 5.34 % H, 5.30 % N; nalezeno 57.46 % C, 5.94 % H, 5.23 % N.

(5)

1-(3-fenylpropyl)pyridinium-bromid



Doba reakce 31,5 h.

Výtěžek 84 %.

T.t. neměřeno (amorfní).

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 9.17 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H – 2, 6), 8.63-8.58 (m, 1H, H – 4), 8.16 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, H – 3, 5), 7.30-7.16 (m, 5H, Ph), 4.70 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, N- CH_2), 2.65 t, 2H, $J = 7.5$ Hz, N-(CH_2) $_2$ - CH_2), 2.30-2.22 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2).

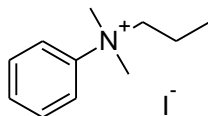
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 145.41, 144.73, 140.21, 128.33, 128.13, 127.95, 126.04, 60.45, 32.03, 31.48.

ESI-MS: m/z 198.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}^+$] 198.29).

EA: neměřeno (amorfní).

(6)

N,N-dimethyl-*N*-propylanilinium-jodid



Doba reakce 28 h.

Výtěžek 72 %.

T.t. neměřeno (amorfní).

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.95-7.87 (m, 2H, H – 2, 6), 7.69 – 7.54 (m, 3H, H – 3, 4, 5), 3.89-3.79 (m, 2H, N- CH_2), 3.62 – 3.56 (m, 6H, N-(CH_3) $_2$), 1.41-1.24 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2), 0.84 – 0.75 (m, 3H, N-(CH_2) $_2$ - CH_3).

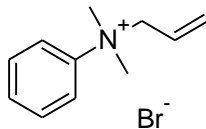
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 144.49, 130.07, 129.95, 121.00, 69.33, 53.66, 16.26, 10.08.

ESI-MS: m/z 164.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}^+$] 164.27).

EA: neměřeno (amorfní).

(7)

N,N-dimethyl-*N*-(prop-2-en-1-yl)anilinium-bromid



Doba reakce 24 h.

Výtěžek 74 %.

T.t. neměřeno (amorfní).

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.93 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, H – 2, 6), 7.68 – 7.53 (m, 3H, H – 3, 4, 5), 5.67-5.42 (m, 3H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.58 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz, $\text{N}-\text{CH}_2$), 3.59 (s, 6H, $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$).

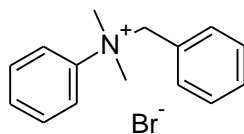
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 144.60, 129.98, 129.96, 127.68, 125.77, 121.21, 70.11, 53.10.

ESI-MS: m/z 162.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}^+$] 162.25).

EA: neměřeno (amorfní).

(8)

N-benzyl-*N,N*-dimethylanilinium-bromid



Doba reakce 9,5 h.

Výtěžek 48 %.

T.t. 170-172 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.93-7.84 (m, 2H, H – 2, 6), 7.64-7.56 (m, 3H, H – 3, 4, 5), 7.45-7.31 (m, 3H, Ph), 7.07-7.01 (m, 2H, Ph), 5.12 (s, 2H, N- CH_2), 3.62 (s, 6H, N-(CH_3) $_2$).

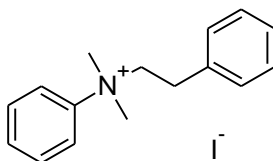
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 144.35, 132.31, 130.20, 130.15, 129.79, 128.45, 128.09, 121.72, 71.58, 52.52.

ESI-MS: m/z 212.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}^+$] 212.31).

EA: vypočítáno 61.65 % C, 6.21 % H, 4.79 % N; nalezeno 61.65 % C, 6.21 % H, 4.79 % N.

(9)

N,N-dimethyl-*N*-(2-fenylethyl)anilinium-jodid



Doba reakce 13,5 h.

Výtěžek 9 %.

T.t. 135-136 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.99 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H – 2,6), 7.76-7.55 (m, 3H, H – 3, 4, 5), 7.36 – 7.12 (m, 5H, Ph), 4.22-4.11 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2 -), 3.67 (s, 6H, N (CH_3) $_2$), 2.74-2.60 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2).

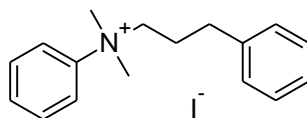
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 144.27, 135.56, 130.21, 130.11, 128.72, 128.58, 126.92, 121.08, 68.27, 53.80, 28.91.

ESI-MS: m/z 226.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}^+$] 226.34).

EA: vypočítáno 54.40 % C, 5.71 % H, 3.97 % N; nalezeno 54.40 % C, 5.71 % H, 3.97 % N.

(10)

N,N-dimethyl-*N*-(3-fenylpropyl)anilinium-jodid



Doba reakce 28,5 h.

Výtěžek 37 %.

T.t. neměřeno (amorfní).

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.93-7.84 (m, 2H, $J = 7.6$ Hz, H – 2, 6), 7.62 (m, 3H, H – 3, 4, 5), 7.32-7.08 (m, 5H, Ph), 3.95-3.86 (m, 2H, N- CH_2), 3.59 (s, 6H, N-(CH_3) $_2$), 2.57 – 2.48 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2), 1.69-1.56 (m, 2H, N-(CH_2) $_2$ - CH_2).

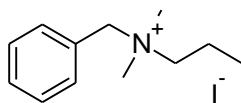
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 144.38, 139.88, 130.06, 129.99, 128.35, 128.07, 126.14, 121.02, 67.58, 53.69, 31.21, 24.48.

ESI-MS: m/z 240.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}^+$] 240.36).

EA: neměřeno (amorfní).

(11)

N-benzyl-*N,N*-dimethylpropan-1-aminium-jodid



Doba reakce 28 h.

Výtěžek 78 %.

T.t. 111-113 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.61-7.46 (m, 5H, Ph), 4.55 (s, 2H, -N-CH₂-Ph), 3.27-3.17 (m, 2H, N-CH₂), 2.96 (s, 6H, N-(CH₃)₂), 1.89-1.73 (m, 2H, N-CH₂-CH₂), 0.91 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, N-(CH₂)₂-CH₃).

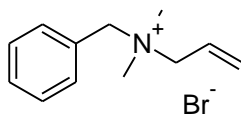
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 132.79, 130.14, 128.81, 127.97, 66.12, 64.62, 49.07, 15.40, 10.43.

ESI-MS: m/z 178.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}^+$] 178.29).

EA: vypočítáno 47.22 % C, 6.61 % H, 4.59% N; nalezeno 47.22 % C, 6.61 % H, 4.59 % N.

(12)

N-benzyl-*N,N*-dimethylprop-2-en-1-aminium-bromid



Doba reakce 120 h.

Výtěžek 89 %.

T.t. neměřeno (amorfní).

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.63-7.48 (m, 5H, Phe), 6.24 – 6.07 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.66 (d, 2H, $J = 12.6$ Hz, -CH=CH₂), 4.60 (s, 2H, N-CH₂-Phe), 4.02 (d, 2H, $J = 7.1$ Hz, N-CH₂-CH), 2.95 (s, 6H, N-(CH₃)₂).

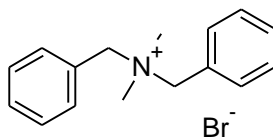
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 132.90, 130.18, 128.81, 127.96, 127.61, 125.97, 66.03, 65.44, 48.62.

ESI-MS: m/z 176.0 [M⁺] (vypočítáno pro [C₁₂H₁₈N⁺] 176.28).

EA: neměřeno (amorfní).

(13)

N-benzyl-*N,N*-dimethylphenylmethanaminium-bromid



Doba reakce 15 h.

Výtěžek 84 %.

T.t. 175-176 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.67-7.58 (m, 4H, H – 2, 2', 6, 6'), 7.58-7.46 (m, 6H, H – 3, 3', 4, 4', 5, 5'), 4.69 (s, 4H, N-(CH₂)₂), 2.88 (s, 6H, N-(CH₃)₂).

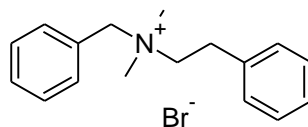
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 133.06, 130.19, 128.82, 127.93, 66.80, 47.95.

ESI-MS: m/z 226.0 [M⁺] (vypočítáno pro [C₁₆H₂₀N⁺] 226.34).

EA: vypočítáno 62.75 % C, 6.58 % H, 4.57 % N; nalezeno 62.75 % C, 6.58 % H, 4.57 % N.

(14)

N-benzyl-*N,N*-dimethyl-2-fenylethanaminium-bromid



Doba reakce 15 h.

Výtěžek 93 %.

T.t. 190-192 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.60 (m, 2H, H – 2,6), 7.55-7.47 (m, 3H, H – 3, 4, 5), 7.39-7.23 (m, 5H, Ph $^{\text{e}}$), 4.68 (s, 2H, N-CH $_2$ -Ph), 3.57-3.49 (m, 2H, N-CH $_2$ -CH $_2$), 3.20-3.12 (m, 2H, N-CH $_2$ -CH $_2$), 3.08 (s, 6H, N-(CH $_3$) $_2$).

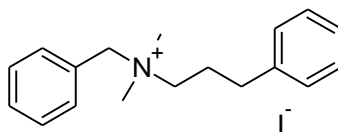
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 136.246, 132.871, 130.202, 128.925, 128.842, 128.622, 128.028, 126.884, 66.206, 63.940, 49.128, 28.104.

ESI-MS: m/z 240.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}^+$] 240.36).

EA: vypočítáno 63.75 % C, 6.92 % H, 4.37 % N; nalezeno 63.75% C, 6.92 % H, 4.37 % N.

(15)

N-benzyl-*N,N*-dimethyl-3-fenylpropan-1-aminium-jodid



Doba reakce 8 h.

Výtěžek 87 %.

T.t. 121-122 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.55-7.46 (m, 5H, Ph), 7.37-7.19 (m, 5H, Ph), 4.54 (s, 2H, N-CH₂-Ph), 3.33-3.24 (m, 2H, N-CH₂-CH₂), 2.97 (s, 6H, N-(CH₃)₂), 2.62 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, N-(CH₂)₂-CH₂), 2.19-2.05 (m, 2H, N-CH₂-CH₂).

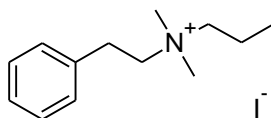
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 140.18, 132.79, 130.14, 128.80, 128.35, 128.33, 127.93, 126.16, 66.08, 62.75, 49.21, 31.63, 23.72.

ESI-MS: m/z 254.0 [M⁺] (vypočítáno pro [C₁₈H₂₄N⁺] 254.39).

EA: vypočítáno 56.70 % C, 6.34 % H, 3.67 % N; nalezeno 56.70 % C, 6.34 % H, 3.67 % N.

(16)

N,N-dimethyl-*N*-(2-fenylethyl)propan-1-aminium-jodid



Doba reakce 107 h.

Výtěžek 93 %.

T.t. neměřeno (amorfní).

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.39-7.23 (m, 5H, Ph), 3.54-3.45 (m, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ph}$), 3.33-3.26 (m, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 3.10 (s, 6H, N- $(\text{CH}_3)_2$), 3.08-2.99 (m, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ph}$), 1.79-1.64 (m, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 0.91 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, N- $(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_3$).

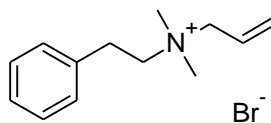
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 136.23, 128.91, 128.54, 126.83, 64.37, 63.58, 49.99, 28.01, 15.38, 10.43.

ESI-MS: m/z 192.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}^+$] 192.32).

EA: neměřeno (amorfní).

(17)

N,N-dimethyl-*N*-(2-fenylethyl)prop-2-en-1-aminium-bromid



Doba reakce 123 h.

Výtěžek 93 %.

T.t. neměřeno (amorfní).

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.40-7.23 (m, 5H, Ph), 6.18 – 6.01 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.73-5.60 (m, 2H, -CH=CH₂), 4.08 (d, 2H, J = 7.2 Hz, N-CH₂-CH=CH₂), 3.53-3.43 (m, 2H, Ph-CH₂-CH₂), 3.13-3.02 (m, 8H, Ph-CH₂-CH₂-N-(CH₃)₂).

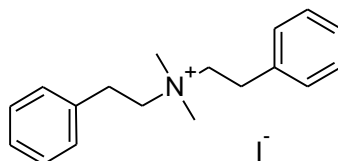
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 136.23, 128.93, 128.59, 127.41, 126.88, 125.99, 65.19, 63.52, 49.70, 27.98.

ESI-MS: m/z 190.0 [M⁺] (vypočítáno pro [C_{x13}H₂₀N⁺] 190.30).

EA: neměřeno (amorfní).

(18)

N,N-dimethyl-2-fenyl-*N*-(2-fenylethyl)ethanaminium-jodid



Doba reakce 15,5 h.

Výtěžek 39 %.

T.t. 162-164 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.40-7.24 (m, 10H, Ph), 3.64-3.55 (m, 4H, N- CH_2), 3.21 (s, 6H, N-(CH_3) $_2$), 3.12-3.03 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2).

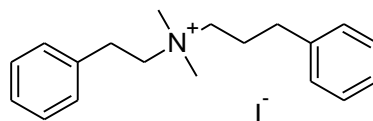
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 136.22, 129.01, 128.57, 126.88, 63.77, 50.03, 28.12.

ESI-MS: m/z 254.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}^+$] 254.39).

EA: vypočítáno 56.70 % C, 6.34 % H, 3.67 % N; nalezeno 56.70 % C, 6.34 % H, 3.67 % N.

(19)

N,N-dimethyl-3-fenyl-*N*-(2-fenylethyl)propan-1-aminium-jodid



Doba reakce 8 h.

Výtěžek 23 %.

T.t. 119-121 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.42-7.18 (m, 10H, Ph), 3.56-3.47 (m, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ph}$), 3.43-3.35 (m, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-Ph}$), 3.11 (s, 6H, N- $\text{(CH}_3\text{)}_2$), 3.05-2.95 (m, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ph}$), 2.61 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, N- $\text{(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_2\text{-Ph}$), 2.10-1.95 (m, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ph}$).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 140.29, 136.21, 128.93, 128.56, 128.34, 128.27, 126.86, 126.13, 63.45, 62.63, 50.10, 31.57, 28.01, 23.72.

ESI-MS: m/z 268.0 [M^+] (vypočítáno pro [$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}^+$] 268.42).

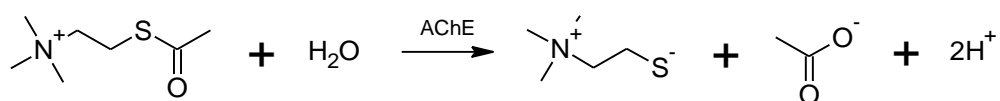
EA: vypočítáno 57.73 % C, 6.63 % H, 3.54 % N; nalezeno 57.73 % C, 6.63 % H, 3.54 % N.

4 Stanovení inhibičních parametrů

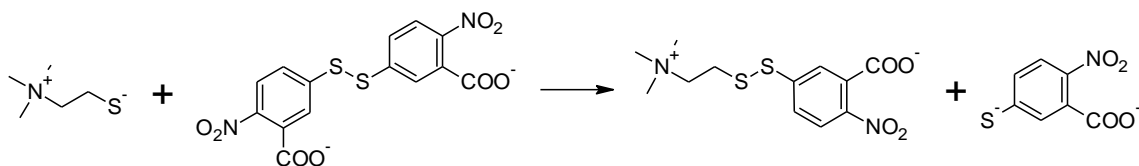
K určení inhibičních parametrů připravených sloučenin byla použita tzv. Ellmanova metoda. Jde o velmi citlivou spektrofotometrickou metodu, která je použitelná i při malém množství tkáně nebo při nízkých koncentracích enzymu [46].

4.1 Princip metody

Metoda je založena na použití acetylthiocholinu jako substrátu pro AChE. Acetylthiocholin je analog přirozeně se vyskytujícího substrátu acetylcholinu. Při jeho hydrolyze pomocí AChE vzniká thiocholin (obr. 17), který následně reaguje s 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoátovým) iontem za vzniku žlutě zbarveného iontu kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (obr. 18). Tím je umožněno spektrofotometricky určit aktivitu AChE [46].



Obrázek 17 Hydrolyza acetylthiocholinu.



Obrázek 18 Vznik 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny.

4.2 Postup měření

K měření aktivity cholinesteras byl použit multikanálový spektrofotometr Sunrise (Tecan, Salzburg, Rakousko). Měření bylo prováděno za standardních podmínek (25 °C, 100 kPa). Jako kvety byly použity polystyrenové destičky s 96 komorami (Nunc, Roskilde, Dánsko).

Lidská rekombinantní AChE nebo lidská plazmatická BChE byla naředěna fosfátovým pufrům (pH 7,4) na aktivitu 0.002 U/μl. Tato směs (5 μl) byla v kyvetě smíchána s fosfátovým pufrům (20 μl) a čerstvě připraveným roztokem 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoové) kyseliny o koncentraci 0.4 mg/ml (20 μl). Nakonec byl do kyvety přidán inhibitor v příslušné koncentraci (100 mM - 1 nM; 5 μl) a celá směs byla inkubována po dobu 5 minut. Poté byl přidán 1mM chloridu acetylthiocholinu ve fosfátovém pufru (20 μl). Po dalších 5 minutách inkubace byla změřena absorbance při 412 nm za automatického protřepávání kyvety.

Inhibice v procentech byla vypočítána podle následujícího vzorce:

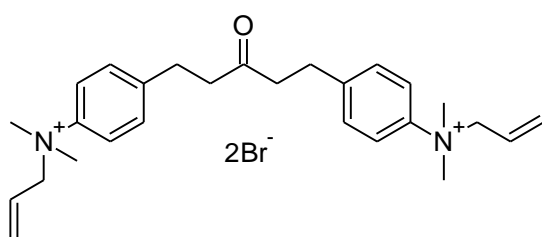
$$I = \left(1 - \frac{\Delta A_i}{\Delta A_0}\right) \times 100$$

ΔA_i vyjadřuje změnu absorbance vyvolanou AChE, která byla vystavena působení inhibitoru.

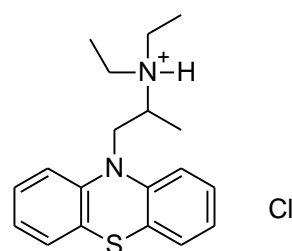
ΔA_0 vyjadřuje změnu absorbance vyvolanou AChE, ke které bylo místo inhibitoru přidáno odpovídající množství fosfátového pufru (slepý vzorek).

IC₅₀ byla stanovena za použití Origin 6.1 (Northampton, MA, USA). Procenta inhibice byla vypočítána pomocí Hillova plotu (n=1). Ostatní varianty plotu nebyly optimální a korelační koeficient u nich byl nižší než u zvolené metody.

Jako referenční látky byly použity selektivní inhibitory BW284c51 (**A**) a ethopropazin (**B**; obr. 19).



BW284c51 (A)



ethopropazin-chlorid (B)

Obrázek 19 Referenční látky.

4.3 Výsledky měření

Pro každou látku byla provedena tři nezávislá měření, data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka a dále byl vypočítán index selektivity ($SI = IC_{50} \text{ BChE} / IC_{50} \text{ AChE}$; tab. 1).

Inhibitor	$IC_{50} \pm SD (\mu M)$		$SI^a \text{ BChE/AChE}$
	hAChE	hBChE	
BW284c51 (A)	0,03 \pm 0,006	354 \pm 58	11800
Ethopropazin (B)	1020 \pm 199	1,6 \pm 0,3	0,002
1	^b	^b	-
2	732 \pm 143	^b	-
3	79 \pm 16	1190 \pm 199	15
4	72 \pm 14	827 \pm 138	11
5	115 \pm 22	681 \pm 114	5,9
6	36 \pm 7	19510 \pm 3258	542
7	67 \pm 1	506 \pm 85	7,6
8	746 \pm 145	711 \pm 118	1,0
9	251 \pm 49	174 \pm 29	0,7
10	168 \pm 33	9 \pm 1	0,05
11	611 \pm 119	1760 \pm 294	2,9
12	459 \pm 97	30320 \pm 5063	66
13	457 \pm 89	523 \pm 87	1,1
14	1120 \pm 219	237 \pm 40	0,2
15	2270 \pm 442	4 \pm 1	0,002
16	4360 \pm 850	17210 \pm 3356	3,9
17	1130 \pm 220	1230 \pm 205	1,1
18	3550 \pm 692	28 \pm 5	0,008
19	142 \pm 28	1,9 \pm 0,3	0,01

Tabulka 1 Výsledky měření inhibičních parametrů látek vůči lidské AChE a BChE.

^a Index selektivity.

^b Žádná inhibice v daném koncentračním rozmezí.

5 Diskuse

U obou použitých referenčních látek (**A**, **B**) byla dle očekávání zjištěna selektivita vůči cholinesterasám. Látka **A** selektivně ($SI = 11800$) inhibovala AChE při koncentraci 30 nM, zatímco látka **B** selektivně ($SI = 0,002$) inhibovala BChE při koncentraci 1,6 μ M.

Z připravených sloučenin se jako nejsilnější inhibitory AChE ukázaly sloučeniny **3**, **4**, **6** a **7**, jejichž hodnoty IC_{50} se pohybovaly v řádu desítek μ M. Z hlediska selektivity vůči AChE dosáhly nejlepších výsledků sloučeniny **6** a **12**, když lepší z nich (**12**) inhibovala AChE 542× více než BChE. Žádná ze sloučenin však nepřekonala referenční látku **A**, ať už z hlediska účinnosti nebo selektivity.

Nejlepší inhibice vůči BChE byla zjištěna u sloučenin **10**, **15** a **19** (řádově jednotky μ M). Nejvyšší selektivita vůči BChE byla zjištěna u sloučenin **15** a **18**, když lepší z nich (**15**) inhibovala BChE přibližně 500× více než AChE. Žádná ze sloučenin tedy nepřekonala referenční látku **B** z hlediska účinnosti ani z hlediska selektivity, jen sloučeniny **15** a **19** se jí dokázaly částečně vyrovnat.

Ostatní sloučeniny vykazovaly pouze slabou (**5**, **8**, **9**, **11**, **13**, **14**, **16**, **17**) nebo žádnou (**1**) inhibici v daném koncentračním rozmezí bez výraznější selektivity. Sloučenina **2** slabě inhibovala AChE a vůči BChE nevykázala žádnou aktivitu (v daném koncentračním rozmezí).

V rámci připravené série sloučenin lze vyvodit určité závěry pro vztah mezi jejich strukturou a aktivitou.

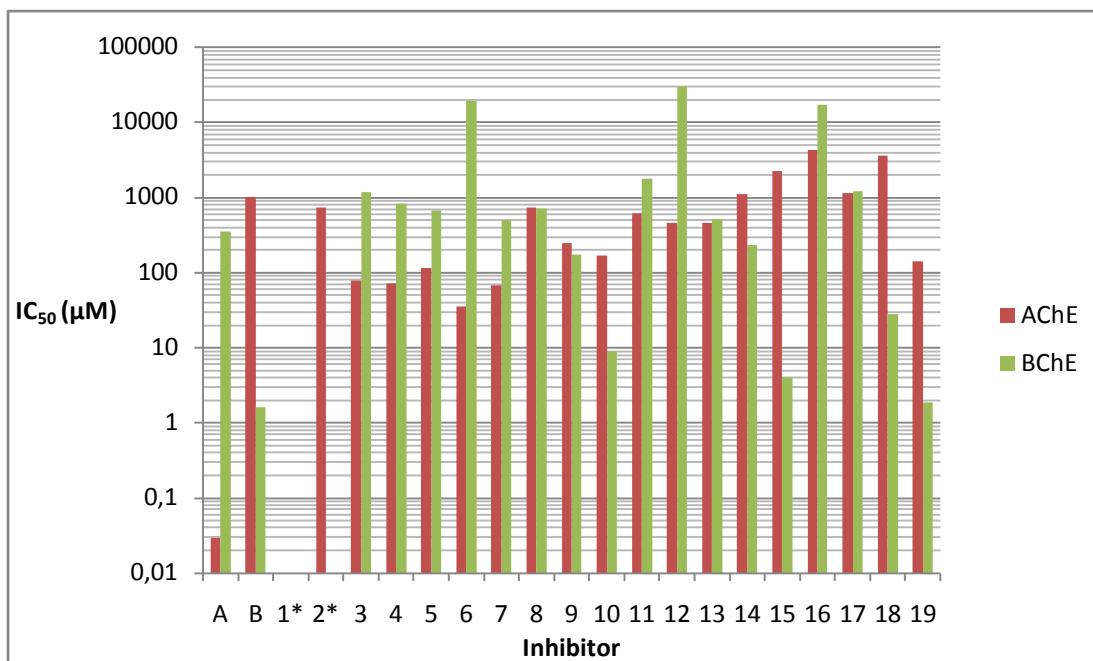
Selektivitu i poměrně dobrou účinnost vůči AChE vykazaly všechny sloučeniny, u kterých byl dusík součástí pyridiniového jádra (**2**, **3**, **4**, **5**), kromě sloučeniny **1**, která nevykázala žádnou inhibici.

Dále vykazaly alespoň minimální selektivitu vůči AChE všechny sloučeniny s jedním aromatickým jádrem a kvarterním dusíkem mimo aromatický kruh (**6**, **7**, **11**, **12**, **16**, **17**). Silnějšími inhibitory se v rámci této skupiny ukázaly sloučeniny s dusíkem buď přímo na aromatickém jádře (**6**, **7**), nebo s dusíkem připojeným přes jeden uhlíkový atom (**11**, **12**).

Selektivitu vůči BChE projevíly všechny sloučeniny se dvěma aromatickými jádry propojenými řetězcem tvořeným alespoň 4 atomy (**10**, **14**, **15**, **18**,

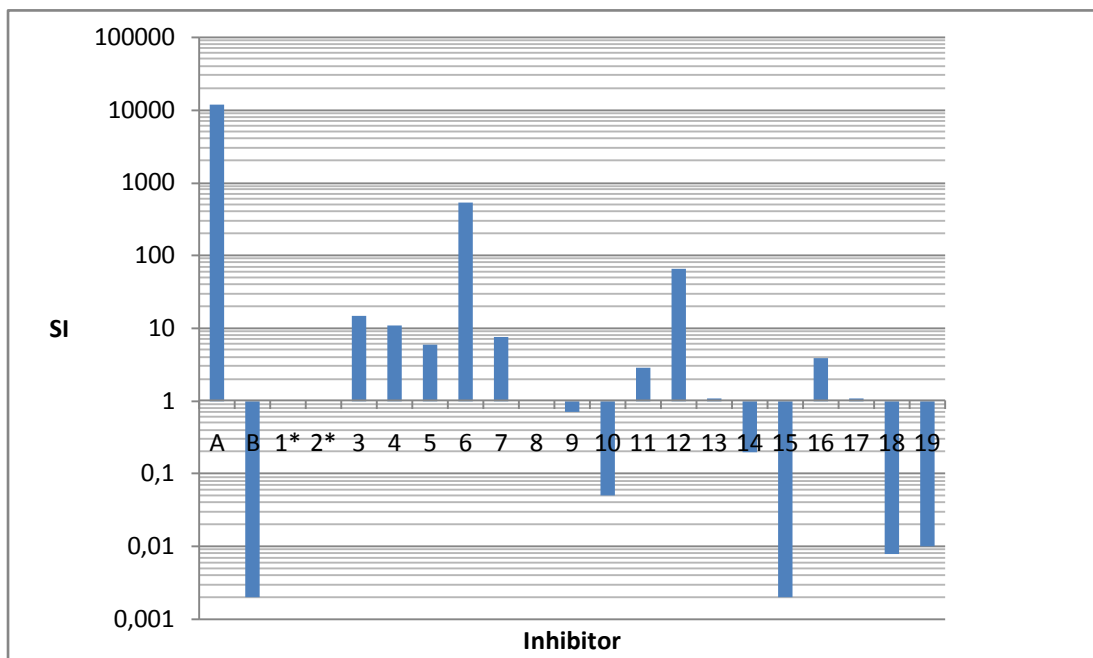
19). V rámci této skupiny vykazovaly silnější inhibiční potenciál sloučeniny, u kterých bylo jedno z aromatických jader připojeno na kvarterní dusík přes trojuhlíkatý alkylový řetězec (**10, 15, 19**).

Inhibiční parametry připravených sloučenin a referenčních látek jsou znázorněny v příložených grafech (graf 1 a 2).



Graf 1 Porovnání hodnot IC₅₀ pro AChE a BChE.

* Nulová hodnota IC₅₀ → žádná inhibice v daném koncentračním rozmezí.



Graf 2 Porovnání selektivity (SI = IC₅₀ BChE / IC₅₀ AChE).

* Nelze vypočítat SI.

6 Závěr

Bylo připraveno 19 potenciálních inhibitorů acetylcholinesterasy s jedním kvarterním dusíkem substituovaným různými uhlovodíkovými zbytky. *In vitro* byla stanovena jejich inhibiční aktivita vůči lidské rekombinantní AChE a lidské plazmatické BChE. Výsledky byly vyjádřeny jako IC_{50} a porovnány se standardy (BW284c51, ethopropazin). Žádná z připravených sloučenin však nevykázala vyšší aktivitu nebo selektivitu než použité referenční látky. Na základě získaných dat byly určeny vztahy mezi strukturou a účinkem připravených sloučenin.

7 Použitá literatura

- [1] Aldridge 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.
- [2] Lincová D.; Farghali H. a kol. Základní a aplikovaná farmakologie. 2. vyd. Galén: Praha, **2002**, s. 71-123.
- [3] Palacios J.; Boddeke H.; Pombo-Vilar E. Cholinergic neuropharmacology: An update. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* **1991**, 366, 27-33.
- [4] Lindstrom J. M. Acetylcholin receptors and myasthenia. *Muscle & Nerve* **2000**, 23, 453-477.
- [5] Arias H. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res. Rev.* **1997**, 25, 133-191.
- [6] Court J.; Martin-Ruiz C.; Graham A.; Perry E. Nicotinic receptors in human brain: Topography and pathology. *J. Chem. Neuroanat.* **2000**, 20, 281-298.
- [7] Lüllmann H.; Mohr K.; Wehling M. Farmakologie a toxikologie. 1. vyd. Grada publishing: Praha, **2004**, s. 82-89.
- [8] Massoulie J.; Sussman J.; Bon S.; Silman I. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog. Brain Res.* **1993**, 98, 139-146.
- [9] Sussman J. L.; Harel M.; Frolow F. et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**, 253, 872-879.
- [10] Bourne Y.; Radic Z.; Sulzenbacher G.; Kim E.; Taylor P.; Marchot P. Substrate and product trafficking through the active center gorge of acetylcholinesterase analyzed by crystallography and equilibrium binding. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281 (39), 29256-29267.
- [11] Harel M.; Schalk L.; Ehret-Sabatier F. et al. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 9031–9035.
- [12] Barak D.; Kronman C.; Ordentlich A.; Ariel N.; Bromberg A.; Marcus D.; Lazar A.; Velan B.; Shafferman A. Acetylcholinesterase peripheral anionic site

degeneracy conferred by amino-acid arrays sharing a common core. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269 (9), 6296-6305.

[13] Soreq H.; Gnatt A.; Loewenstein Y.; Seville L. Excavations into the active-site gorge of acetylcholinesterase. *TIBS* **1992**, 17, 353-358.

[14] Roufogalis B. D.; Quist E. E. Relative binding sites of pharmacologically active ligands on bovine erythrocyte acetylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* **1972**, 8, 41-49.

[15] Szegletes T.; Mallender W. D.; Thomas P. J.; Rosenberry T. L. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry* **1999**, 38(1), 122-133.

[16] Bourne Y.; Taylor P.; Radic Z.; Marchot P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *Embo J.* **2003**, 22 (1), 1-12.

[17] Kutty K.; Payne R. Serum pseudocholinesterase and very low-density lipoproteins metabolism. *J. Clin. Lab. Anal.* **1994**, 8, 247-250.

[18] Balasubramanian A. Amyloid beta peptide processing, insulin degrading enzyme and butyrylcholinesterase. *Neurochem. Res.* **2001**, 26, 453-456.

[19] Schwarz M.; Glick D.; Loewenstein Y.; Soreq H. Engineering of human cholinesterase explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmacol. Ther.* **1995**, 67, 283-322.

[20] Perry E.; Perry R.; Blessed G.; Tomlinson B. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1978**, 4, 273-277.

[21] Schneide F.; Steenland K.; Hrenandez B.; Wilson B.; Krieger R.; Spencer J.; Margetich S. Monitoring peach harvest workers exposed to azinephosphomethyl residues in Sutter country, California 1991. *Environ. Health Prospect*, **1994**, 102, 580-585.

[22] Ashani Y.; Shapira S.; Levy D.; Wolfe A.; Doctor B.; Raveh L. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase prophylaxis against soman poisoning in mice. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, 41, 37-41.

[23] Gupta R. Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds. 1st ed. *Academic Press: Burlington*, **2006**, p. 5-380.

- [24] Musilek K.; Roder J.; Komloova M.; Holas O.; Hrabanova M.; Pohanka M.; Dohnal V.; Opletalova V.; Kuca K.; Jung Y. 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 (1), 150-154.
- [25] Patočka J. a kol. *Vojenská toxikologie*, 1. vyd. *Grada publishing: Praha*, **2004**, s. 30-44.
- [26] Bajgar J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Adv. Clin. Chem.* **2004**, 47, 215-228.
- [27] Doležal M. a kol. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. 1. vyd. *Karolinum: Praha*, **2009**, s. 52-68.
- [28] Patočka J.; Kuča K.; Jun D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Act. Med. HK.* **2004**, 47, 215-228.
- [29] Sungur M.; Guven M. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Crit. Care* **2001**, 5, 211-215.
- [30] Kamanyire R.; Karalliedde L. Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occup. Med.* **2004**, 54, 69-75.
- [31] Senanayake N.; Karalliedde L. Neurotoxic effect of organophosphorus insecticides: an intermediate syndrome. *N. Engl. J. Med.* **1987**, 316, 761-763.
- [32] Johnson M. K. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. *Biochem. J.* **1969**, 14, 711-717.
- [33] Jokanovic M.; Prostran M.; Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators. Structure-Activity Relationship and Efficacy in the Treatment of Poisoning with Organophosphorus Compounds. *Curr. Med. Chem.* **2009**, 16 (17), 2177-2188.
- [34] McDonough J. Jr.; Zoefel L.; McMonagle J.; Copeland T.; Smith C.; Shih T. Anticonvulsant treatment of nerve agent seizures: anticholinergics versus diazepam in soman-intoxicated guinea pigs. *Epilepsy Res.* **2000**, 38, 1-14.
- [35] Marrs T. Diazepam in the treatment of organophosphorus ester pesticide poisoning. *Toxicol. Rev.* **2003**, 22, 75-81.
- [36] Antonijevic B.; Stojilkovic M. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *Clin. Med. Res.* **2007**, 1, 71-82.

- [37] Musílek K.; Holas O.; Hambálek J.; Kuča K.; Jun D.; Dohnal V.; Doležal M. Synthesis of bispyridinium compounds bearing propane linker and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxone inhibited AChE. *Lett. org. chem.* **2006**, *3*, 831-835.
- [38] 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* (1-3), 10-17.
- [39] Bajgar J.; Fusek J.; Kuča K.; Bartošová L.; Jun D. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2007**, *5*, 461-466.
- [40] Patocka J.; Jun D.; Bajgar J.; Kuca K., Prophylaxis against nerve agent intoxications. *Defence Sci. J.* **2006**, *56* (5), 775-784.
- [41] Lallement G.; Baille V.; Baubichon D.; Carpentier P.; Collombet J. M.; Filliat P.; Foquin A.; Four E.; Masqueliez C.; Testylier G.; Tonduli L.; Dorandeu F. Review of the value of huperzine as pretreatment of organophosphate poisoning. *Neurotoxicology* **2002**, *23* (1), 1-5.
- [42] Doctor B. P.; Raveh L.; Wolfe A. D.; Maxwell D. M.; Ashani Y. Enzymes as pretreatment drugs for organophosphate toxicity. *Neurosci. Biobehav. R.* **1991**, *15* (1), 123-128.
- [43] Doctor B. P.; Saxena A. Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *157*, 167-171.
- [44] Lenz D. E.; Yeung D.; Smith, J. R.; Sweeney R. E.; Lumley L. A.; Cerasoli D. M. Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: A mini review. *Toxicology* **2007**, *233* (1-3), 31-39.
- [45] Bajgar J.; Fusek J.; Kassa J.; Kuca K.; Jun D. Chemical Aspects of Pharmacological Prophylaxis Against Nerve Agent Poisoning. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16* (23), 2977-2986.
- [46] Ellman G. L.; Courtney K. D.; Andres V.; Featherstone R. M. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.