

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

Syntéza a *in vitro* testování  
inhibitorů acetylcholinesterasy  
bispyridiniového typu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Michal Kočí  
Školitel: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.  
Školitel specialista: doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.  
Ak. rok: 2011/12

## **PROHLÁŠENÍ O AUTORSTVÍ**

*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.*

*Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV-2012-265-001 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR.*

*V Hradci Králové dne 14. 5. 2012*

.....  
*Michal Kočí*

## **PODĚKOVÁNÍ**

*Děkuji panu prof. PharmDr. Martinovi Doležalovi, Ph.D. a panu doc. PharmDr. Kamilovi Musílkovi, Ph.D. za jejich odborné vedení a rady v průběhu celé práce.*

# Obsah

<b>1</b>	<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
4.1	ACETYLCHOLIN .....	10
4.2	ACETYLCHOLINESTERASA .....	12
4.3	INHIBITORY AChE .....	15
4.4	ORGANOFOSFÁTY .....	18
<b>5</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>29</b>
5.1	SYNTÉZA .....	29
5.2	<i>IN VITRO</i> TESTOVÁNÍ INHIBIČNÍCH VLASTNOSTÍ.....	46
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>49</b>
7.1	POSTUP .....	49
7.2	VÝSLEDKY.....	50
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>POUŽITÉ ZDROJE</b> .....	<b>53</b>

# 1 Abstrakt

## Syntéza a *in vitro* testování inhibitorů acetylcholinesterasy bispyridiniového typu

Kompetitivní inhibitory acetylcholinesterasy (AChE, EC 3.1.1.7) mají uplatnění v AČR jako profylaktika otrav nervově-paralytickými látkami. Cílem práce bylo racionálně navrhnout nové struktury ze skupiny bis-kvarterních pyridiniových sloučenin, nasyntetizovat je a posléze stanovit jejich aktivitu *in vitro*.

Sloučeniny byly designovány jako biskvarterní molekuly vycházející z různě substituovaných pyridinových derivátů a variabilních spojovacích můstků (6–12členný alkylen). Ze skupiny látek s hydroxyalkylovou substitucí byly úspěšně nasyntetizovány produkty odvozené od 4-(3-hydroxypropyl)pyridinu. Druhý, lipofilní strukturní typ připravovaných inhibitorů pak vycházel z ethylesteru kyseliny isonikotinové.

Syntéza probíhala v prostředí dimethylformamidu za teplot mezi 60 °C a 75 °C. Po následném přečištění byly totožnost a čistota látek potvrzeny NMR analýzou, hmotnostní spektrometrií a elementární analýzou. K testování inhibičního potenciálu byla využita metoda dle Ellmana.

Celkem bylo připraveno 14 molekul, po 7 z obou strukturních skupin. Sloučeniny obou skupin se ukázaly jako perspektivní inhibitory lidské acetylcholinesterasy i butyrylcholinesterasy. Nejvýraznější inhibiční vlastnosti měly struktury s undecylenovým spojovacím řetězcem ( $IC_{50} \sim 10^{-6}$  mol/l). Hydrofilní sloučeniny vykazovaly inhibici duální (SI ~ 3), zatímco lipofilnější inhibitory byly mírně selektivní vůči acetylcholinesterase (SI ~ 10). Potenciálně nejperspektivnější sloučeninou se stala molekula **13** (undec-1,11-diyl-bis(4-ethoxykarbonylpyridinium)-dibromid), která vykazovala druhý nejsilnější inhibiční potenciál a zároveň relativní selektivitu vůči AChE.

## Synthesis and *in vitro* evaluation of bispyridinium type acetylcholinesterase inhibitors

Competitive acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) inhibitors are routinely used as prophylactics against nerve agents intoxication in the Czech Army. The goal of the thesis has been to rationally design new bis-quaternary pyridinium compounds, prepare them and finally assess their *in vitro* inhibition activity.

The molecules have originated in variably substituted pyridine-derivates and different connecting linkages (6–12 carbon atoms). Compounds derived from 4-(3-hydroxypropyl)pyridine were successfully synthesized as the representatives of the hydroxyalkyl-derived inhibitors; the more lipophilic inhibitors have been derived from ethyl-isonicotinate.

The preparation took place in dimethylformamide, at temperatures varying from 60 °C to 75 °C. The identity and purity of the prepared compounds were confirmed by NMR-analysis, elementary analysis and mass spectrometry. Finally, the Ellman's method was used for the inhibitory screening.

14 molecules were synthesised, 7 substances from each structural group. Compounds of both series showed significant inhibitory properties towards human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, the strongest inhibitors being the compounds bearing undecylen-linkage ( $IC_{50} \sim 10^{-6}$  mol/l). Hydrophylic molecules presented dual-inhibition activity (SI  $\sim 3$ ), whereas the lipophilic ones were assessed as acetylcholinesterase-more selective (SI  $\sim 10$ ). The most promising molecule was the compound **13** (undec-1,11-diyl-bis(4-ethoxycarbonylpyridinium)-dibromide) that showed both strong inhibiting potential (the second strongest of all synthesised molecules) and at the same time increased selectivity towards AChE.

## 2 Seznam zkratek

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEI	inhibitor acetylcholinesterasy
ATCh	acetylthiocholin
BChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervový systém
DMF	dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTNB	kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
EA	elementární analýza
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie využívající ionizace elektrosprejem
GIT	gastro-intestinální trakt
IC <sub>50</sub>	koncentrace inhibitoru, při které poklesne aktivita sledovaného enzymu na 50 %
i. m.	intramuskulární podání
IUBMB	Mezinárodní biochemická a molekulárně-biologická unie
i. v.	intravenózní podání
NMR	nukleární magnetická rezonance
NPL	nervově-paralytická látka
OP	organofosfát

PIO	prostředky individuální ochrany
SI	index selektivity
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialové záření
VNS	vegetativní nervový systém



### 3 Úvod

Enzym acetylcholinesterasa (AChE), známý již téměř 80 let [1], je pro lidský život nepostradatelný. Ještě dříve byly objeveny sloučeniny, které funkci tohoto enzymu ovlivňovaly. Nejvýrazněji se do širokého povědomí dostaly inhibitory AChE, a to především díky využití nervově-paralytických látek (NPL) v bojových konfliktech. V moderní době je postupně klinický význam těchto látek přehodnocován ruku v ruce s objevováním jejich dalšího využití. Jedním z nich je jejich profylaktické podávání právě proti účinkům NPL.

NPL, z chemického hlediska klasifikované mezi organofosfáty (OP), farmakologicky působí mechanismem ireverzibilní inhibice AChE [2]. Pokud je však tento enzym nejprve inaktivován jiným, reverzibilním inhibitorem, NPL se na něj navázat nemůže. Samotný enzym po čase regeneruje a může opět zastávat svou fyziologickou funkci [3].

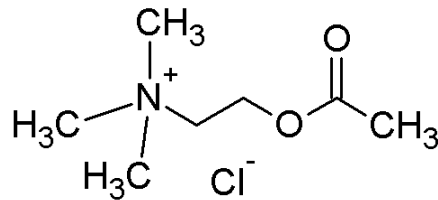
Bohužel, v současnosti užívané reverzibilní inhibitory mají řadu nežádoucích účinků, a tak je pochopitelná snaha najít profylaktika k tomuto účelu vhodnější. Cílem mé práce proto bylo navrhnout a připravit potenciální reverzibilní inhibitory AChE a posléze jejich reálnou inhibiční aktivitu změřit v podmínkách *in vitro*.

## 4 Teoretická část

### 4.1 Acetylcholin

#### 4.1.1 Funkce

Acetylcholin je jedním ze základních neuromediátorů v lidském organismu. Ve vegetativním nervovém systému (VNS) má naprosto stěžejní funkci, jelikož působí na všech presynaptických gangliích a na postsynaptických parasymphatických zakončeních. Z hlediska somatického nervového systému nachází své uplatnění na nervosvalové ploténce; a konečně ho najdeme také v centrálním nervovém systému (CNS), kde se podílí na celé řadě procesů, fyziologických i patologických (dnes již je například prokázána souvislost mezi hladinou ACh a Alzheimerovou chorobou [4]).



acetylcholin-chlorid

ACh působí na cílové buňky skrze dva typy receptorů – nikotinové a muskarinové [5]:

1. Nikotinové receptory se vyskytují primárně na nervosvalové ploténce a na pre-gangliových synapsích VNS. Pochopitelně je najdeme i v CNS. Jedná se o receptory spřažené s relativně nespecifickým iontovým kanálem, po jejichž aktivaci následuje depolarizace a velmi rychlá odpověď (v řádu milisekund) postsynaptické buňky. Svůj název získaly tyto receptory díky skutečnosti, že k nim vykazuje agonistickou aktivitu mimo jiné také alkaloid nikotin [6].
2. S muskarinovými receptory se setkáme především v efektorových orgánech parasymphatiku a, podobně jako u nikotinových receptorů, také v CNS. Z funkčního hlediska spadají do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem. Odpověď buněk je proto o několik řádů pomalejší než u předchozího typu. Svůj název získaly muskarinové receptory podle svého dalšího agonisty, muskarinu [7].

### 4.1.2 Syntéza

ACh je syntetizován v presynaptickém neuronu z cholinu a acetylkoenzymu A [8]. Tuto reakci katalyzuje enzym cholinacetyltransferasa. Zdrojem acetylkoenzymu A jsou mitochondrie, zatímco cholin je do neuronu zpětně přečerpáván ze synaptické štěrby (Schéma 1).

### 4.1.3 Degradace

Rozklad ACh umožňuje hydrolytický enzym AChE. Tomuto enzymu se podrobněji věnuje další kapitola.

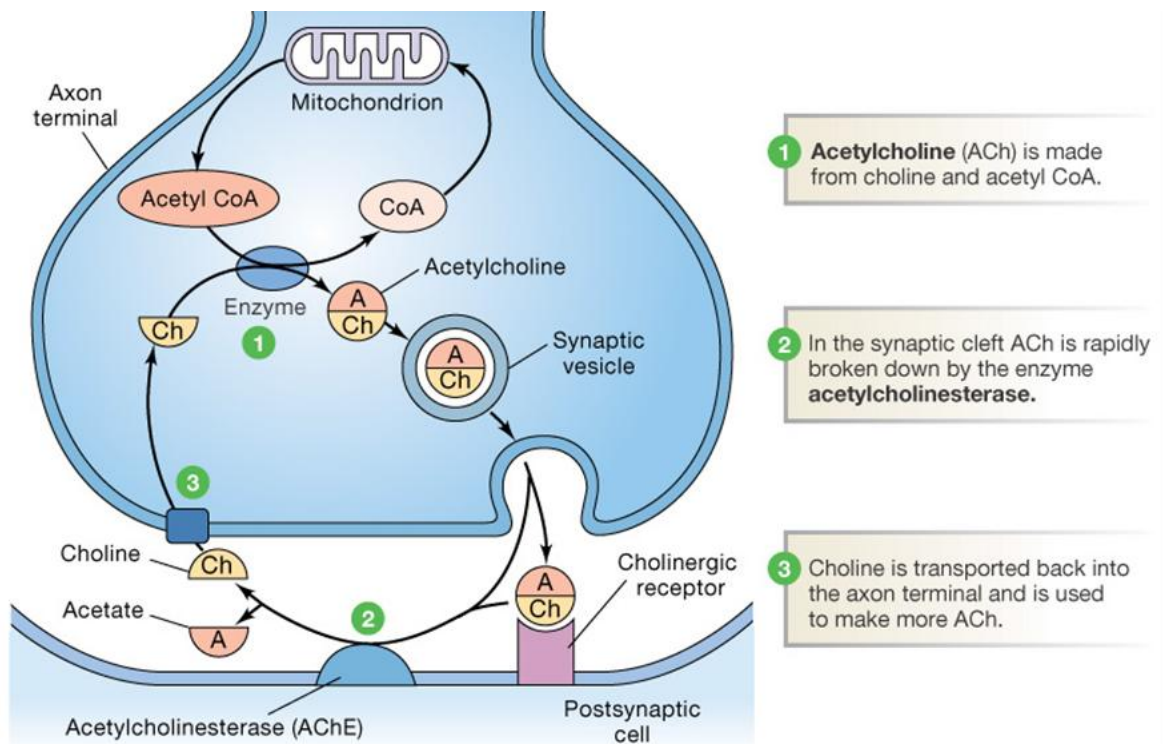


Schéma 1 Cholinergní synapse [55]

## 4.2 Acetylcholinesterasa

### 4.2.1 Charakteristika, funkce

Acetylcholinesterasa je hydrolytický enzym klasifikovaný dle Mezinárodní biochemické a molekulárně-biologické unie (IUBMB) jako EC 3.1.1.7. Funkčně je enzym řazen do skupiny serinových hydrolas. Tato hydrolasa má velmi vysokou katalytickou aktivitu (v řádu  $10^4$  rozložených molekul substrátu za sekundu) a patří tak mezi nejefektivnější lidské enzymy vůbec. Primární úlohou AChE je rozklad ACh uvolněného z nervového zakončení.

Z hlediska struktury se jedná o monogenní protein tvořený řetězcem  $\alpha$  a  $\beta$ . Aktivní místo enzymu je tvořeno  $\alpha$ -anionickým místem (dodnes zkoumaná oblast proteinu; zásadní roli hrají tryptofan Trp-84 a fenylalaniny Phe-330 a Phe-331) reagujícím s amoniovou skupinou ACh a esteratickým místem, kde se na hydroxyl serinu Ser-200 váže odstupující zbytek kyseliny octové. Nezbytnými komponentami esteratického místa jsou také histidin His-440 a glutamát Glu-327 (což je neobvyklé, neboť u většiny příbuzných enzymů je tato triáda aminokyselin dotvářena nikoliv glutamátem, ale aspartátem), které umožňují následné odštěpení zbytku kyseliny octové. Po uvolnění cholinu (ten je posléze reutilizován, viz kap. 4.1.2) je pak enzym připraven k další katalýze [9].

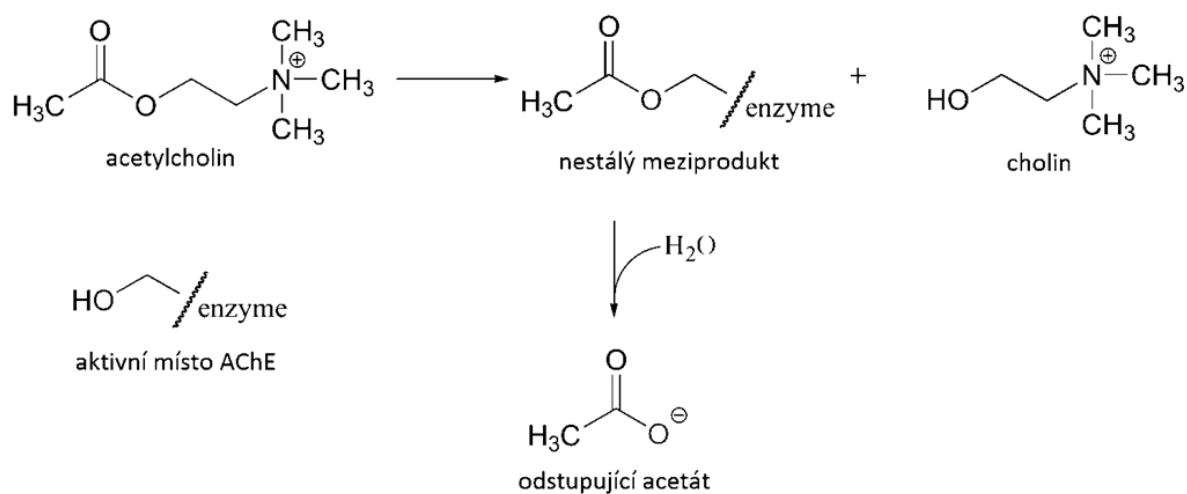


Schéma 2 Rozklad ACh [56]

## 4.2.2 Historie

AChE byla poprvé popsána Stedmanem roku 1932 [1], ačkoliv o existenci tohoto enzymu byla vědecká veřejnost přesvědčena již dříve. Roku 1968 se poprvé podařilo enzym izolovat, konkrétně W. Leuzingerovi na Kolumbijské univerzitě v New Yorku z elektrického úhoře [10]. 3D model AChE pak byl popsán Sussmanem roku 1991 [11].

## 4.2.3 Typy, výskyt

Gen pro AChE je lokalizován na 7. chromozomu, konkrétně na pozici 7q22 [12]. Ačkoliv je tento gen pouze jeden, díky alternativnímu splicingu se u člověka můžeme setkat se dvěma formami AChE:

1. Tetramerní forma AChE<sub>T</sub> se nachází v mozku, svalech i většině ostatních tkání. Tato forma, často označovaná jako hydrofilní, dále asociuje s různými neproteinovými zbytky. Na nervosvalové ploténce tak nacházíme asymetrickou AChE s kolagenovými podjednotkami; symetrická forma asociovaná s komplexem *PRiMA* je typická pro nervová spojení. V obou případech slouží tyto nebilkovinné složky k udržení enzymu v mezibuněčném prostoru [13].
2. Naproti tomu erythrocytární forma AChE<sub>H</sub> obsahuje na C-konci hydrofobní peptid s glykosylfosfatidylinositolovou kotvou [13]. Ta enzym udržuje „přichycený“ na vnější membráně červené krvinky, kde je součástí Cartwrightova antigenního systému. Důležitost AChE<sub>H</sub> vystupuje do popředí u pacientů s paroxysmální noční hemoglobinurií, u kterých byla opakovaně zaznamenána výrazně snížená aktivita tohoto enzymu [14] [15] [16].

Kromě těchto dvou základních forem byl u myši objeven ještě třetí typ, AChE<sub>R</sub>, který se podílí na stresové odpovědi organismu a pravděpodobně také na průběhu zánětu [17].

#### 4.2.4 Butyrylcholinesterasa

Vedle AChE nalezneme u člověka ještě jednoho zástupce cholinesteras – enzym označovaný jako butyrylcholinesterasa (BChE), nespecifická cholinesterasa či pseudocho-  
linesterasa. Tento enzym (klasifikační označení EC 3.1.1.8) rozkládá celou řadu esterů, jak  
endogenních, tak také exogenních. Svůj název získal díky skutečnosti, že syntetický buty-  
rylcholin rozkládá rychleji než ACh.

Co se týče významu BChE pro člověka, zdá se, že její původní fyziologickou funk-  
cí je rozklad ghrelinu [18]; z klinického hlediska je velmi důležitý metabolismus sukcinyl-  
cholinu, který katalyzuje právě BChE. BChE rozkládá také některá lokální anestetika.

Další důležitý fakt je ten, že OP se vážou na BChE stejně jako na AChE. Právě díky  
této afinitě BChE funguje jako přirozený scavenger při otravě OP. Pokles aktivity orga-  
nismus nepoškodí, zatímco snížením hladiny OP v krvi se úměrně snižuje také toxicita [19]  
[20]. Před několika lety proto proběhly i první pokusy získat rekombinantní BChE z mléka  
transgenních koz, právě pro účely profylaxe proti otravě OP (také viz kap. 4.4.6.2) [21].

Navíc, kovalentní vazba AChEI (NPL, pesticidů či karbamátů) na plazmatickou  
BChE může být využita při diagnóze otravy. V praxi byla testována metoda hmotnostní  
spektrometrie vzorků získaných z plazmy postiženého jedince [22].

## 4.3 Inhibitory AChE

### 4.3.1 Obecná charakteristika

Inhibitory AChE (AChEI) jsou sloučeniny, které působí prostřednictvím blokády odbourávání ACh a způsobují tak jeho následnou kumulaci na synapsích. Z farmakologického hlediska se tedy jedná o parasymptomimetika.

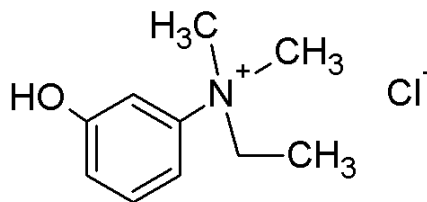
Historicky byl jako první objeven fysostigmin. Již v roce 1864 jej Kleinwächter úspěšně použil jako antidotum při otravě atropinem. Na přelomu století byly odhaleny jeho anti-kurarové účinky [23]. Ve třicátých letech pak byly objeveny první organofosfáty.

Dnes již mají AChEI nezanedbatelnou roli v mnoha oblastech lidské činnosti – vedle vojenského využití také jako velmi efektivní, byť toxické pesticidy; a kapitolou samou o sobě je klinická aplikace těchto látek.

AChEI se dělí dle mechanismu účinku na neacylující (kompetitivní) inhibitory a na inhibitory acylující, tedy karbamáty a organofosfáty (kterým je věnována kapitola 4.4) [24]. Vedle nich bývá formálně vyčleňována skupina léčiv působících centrálně. Tam patří zejména přípravky užívané při terapii Alzheimerovy nemoci – karbamát rivastigmin a dále galanthamin, donepezil a již obsoletní takrin [25].

### 4.3.2 Neacylující inhibitory

V početně nejchudší skupině AChEI dnes nalezneme jediného užívaného zástupce – aromatický analog ACh edrofonium-chlorid. Sloučenina kompetuje s ACh ve vazbě na anionické místo AChE, ale neváže se na serinový hydroxyl. Proto inhibice způsobená edrofoniem přetrvává jen krátkou dobu (cca 10 min). Efekt se projevuje zejména na nervosvalové ploténce. Z toho vyplývá klinické využití edrofonia k diagnostickému odlišení Myasthenia gravis a cholinergní krize. U pacientů s myastenii dojde po podání edrofonia k přechodnému zlepšení stavu (zvýšením hladiny ACh), zatímco v případě cholinergní krize dojde ke krátkodobému zhoršení [26]. Dalším praktickým využitím může být společné podání s atropinem u pacientů, kteří mají po podání periferních myorelaxancií (např. atrakuria) potíže se zahájením spontánního dýchání [27].

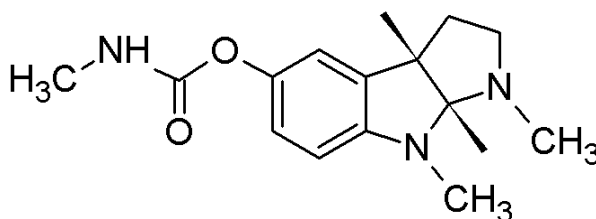


edrofonium

### 4.3.3 Karbamáty

Karbamáty jsou sloučeniny, které strukturně vychází z již zmiňovaného alkaloidu fysostigminu. Mechanismus účinku těchto molekul spočívá v esterifikaci serinového hydroxyly AChE karbamovou kyselinou. Takto vzniklý komplex spontánně hydrolyzuje, ale v závislosti na typu karbamátu různě rychle – od minut až po hodiny.

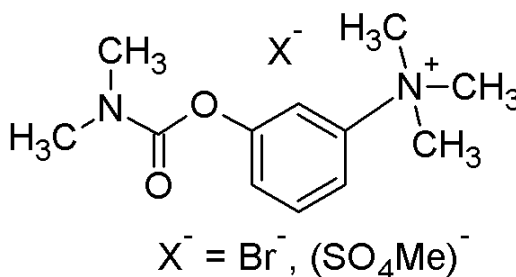
Alkaloid fysostigmin je obsažen v semenech rostliny *Physostigma venenosum*, puchýřnatce jedovatého. Medicínský význam fysostigminu klesal úměrně se zaváděním novějších reverzibilních AChEI; dnes se využívá již jen v očním lékařství, k navození krátkodobé miózy a ke snížení nitroočního tlaku [24]. Od užívání jako profylaktika proti NPL se upustilo kvůli jeho nežádoucím účinkům.



fysostigmin

Ke klinicky významným zástupcům této skupiny patří především kvarterní soli neostigmin a pyridostigmin, dále pak také novější molekuly distigmin a ambenonium.

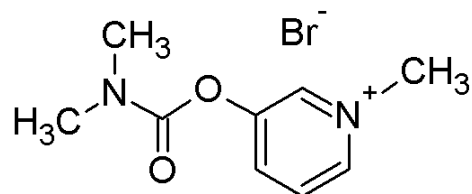
Neostigmin (ve formě bromidu, event. methylsulfátu), který má oproti fysostigminu delší účinek, se používá jednak k léčbě Myasthenia gravis, jednak při postoperační atonii střev a močového měchýře, a také pro zvrácení účinku nedepolarizujících myorelaxancií [24] [28].



neostigmin



Pyridostigmin-bromid je sloučenina svým farmakologickým profilem příbuzná molekule předchozí. Její účinek je slabší, ale její efekt přetrvává po delší dobu. Velmi hojně se používá při léčbě Myasthenia gravis [29]; oproti neostigminu má však i další indikace. Teprve nedávno se objevily pokusy využít pyridostigmin při terapii ortostatické hypotenze [30].



pyridostigmin

Z hlediska této diplomové práce je nejdůležitější skutečnost, že v mnoha armádách je pyridostigmin využíván jako profylaktikum proti otravě OP (viz kap. 4.4.6.3). Oproti dříve užívanému fysostigminu vykazuje výrazně méně nežádoucích účinků, a to zejména centrálních, jelikož jako kvarterní báze neprochází do CNS.

Objevují se však dohady, že jeho preventivní používání, dříve hodnocené v profylaktických dávkách jako téměř bezrizikové [31], může mít na zdraví vojáků poměrně zásadní dopady. Vedle známých nežádoucích účinků (křeče, průjem, bolesti GIT) se v poslední době vyskytly spekulace o možném spojení podávání profylaktických dávek pyridostigminu a tzv. Syndromu války v Perském zálivu (obtížně klasifikovatelný souhrn symptomů sahajících od zvýšené únavnosti a trvalých průjmů až po neurologické potíže a zvýšený výskyt vrozených vad u potomků veteránů války v Perském zálivu) [32].

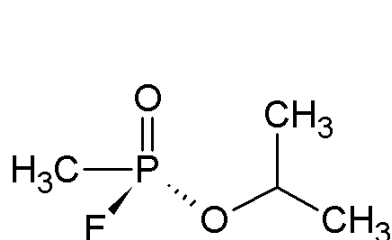
## 4.4 Organofosfáty

### 4.4.1 Charakteristika

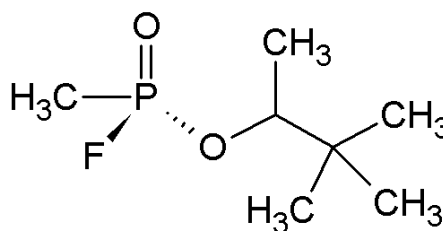
Chemicky jsou organofosfáty (OP) estery kyseliny fosforečné, kyseliny fosfonové a jejich sírných analogů. Z hlediska využití patří zástupci OP mezi nejnebezpečnější otravné látky – NPL; v dnešním průmyslu se také široce uplatňují coby insekticidy [33]. Co se týče klinického uplatnění, dříve se při terapii glaukomu užíval paraoxon, který vzniká také při metabolizaci insekticidu parathionu. Jako miotikum může být využit derivát kyseliny thiofosforečné echothiofát [24].

NPL jsou kapalné, vysoce toxické substance, které mohou do organismu pronikat všemi branami vstupu. K jejich nebezpečnosti přispívá i lehká dostupnost, jelikož jejich syntéza je relativně snadná a velmi laciná [33].

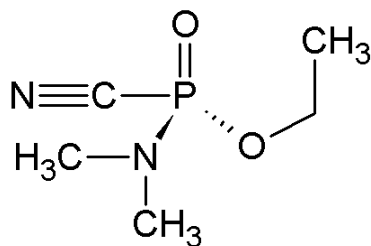
Starší látky skupiny G (odvozené od kyseliny fosfonové) jsou bezbarvé, vysoce těkavé sloučeniny rozpustné v organických rozpouštědlech, ale částečně také ve vodě. Právě díky jejich těkavosti je u nich nejčastější branou vstupu do organismu dýchací ústrojí. Perzistence těchto sloučenin se udává mezi 12 až 24 hodinami [33].



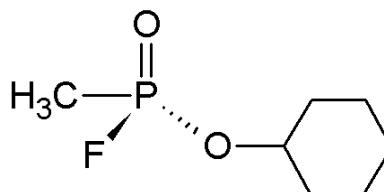
sarin



soman

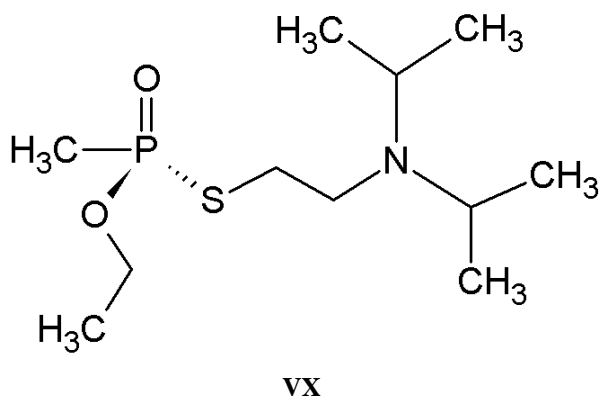


tabun

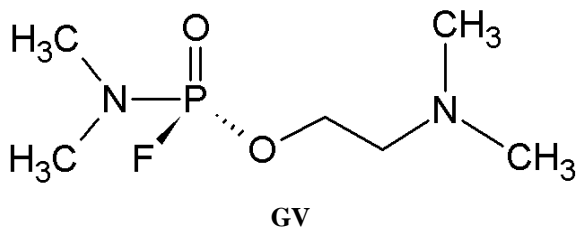


cyklosarin

V-látky, chemicky deriváty kyseliny thiofosfonové, jsou oproti předchozí skupině výrazně méně těkavé a také méně rozpustné ve vodě. Proto se ve vodě, ale i v terénu dokážou udržet daleko delší dobu (týdny až měsíce). Tyto sloučeniny se typicky vstřebávají přes kůži (i neporušenou). Kromě nejrozšířenější britské VX známe i její ruskou a čínskou variantu [33].



Poslední skupinou jsou látky středně těkavé (Intermediate Volatility Agents). Tyto substituované fluorofosfáty naštěstí nebyly nikdy zavedeny do aktivní výzbroje žádné armády. Svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi se řadí mezi obě výše zmíněné skupiny. Původní předlohou těchto látek je látka GV [33].



#### 4.4.2 Historie NPL

Vůbec poprvé se výzkumem NPL zabývali vědci v předválečném Německu na počátku 30. let s původním záměrem vynalézt účinnější insekticidy. Jako první byla dokončena syntéza tabunu roku 1936 chemikem Schraderem. Následovalo objevení sarinu v roce 1938. Po zhodnocení jejich potenciálu jako chemických zbraní byla o rok později zavedena masová výroba; v širokém měřítku však tabun, sarin ani ostatní NPL nebyly během 2. světové války použity. Soman a cyklosarin byly připraveny až v jejím průběhu. Účinnější V-látky byly objeveny na počátku 50. let [34].

Od konce druhé světové války byly OP (především sarin) použity ve větším měřítku během irácko-iránské války v osmdesátých letech ze strany Iráku. Právě to byl jeden z důvodů, proč se během války v Perském zálivu koaliční jednotky tolik obávaly použití NPL, ačkoliv k němu nakonec nedošlo [35].

V devadesátých letech došlo ke dvěma nechvalně známým teroristickým útokům japonské teroristické skupiny Aum Shinrikyo:

1. 27. června 1994 došlo k útoku sarinem ve městě Matsumoto, kde zahynulo 8 lidí a více než 200 bylo zraněno [36]. Paradoxně tehdy policie vydala varování, že pokud by se takový útok měl opakovat v uzavřeném prostoru, například metru, následky by byly daleko horší.
2. Přesně to se stalo o necelý rok později, 20. března 1995 v Tokyu. Při tomto druhém útoku (opět byl použit sarin) zahynulo 13, vážně bylo zraněno téměř 100 a lehce více než 2000 lidí. Jednalo se o největší útok na japonské půdě od konce 2. světové války [37].

Posledním dokumentovaným použitím NPL je odpálení binární nálože s prekurzory sarinu v Iráku 14. května 2004. Celkové množství uvolněného sarinu bylo nakonec velmi malé; buď došlo k rozložení větší části prekurzorů již před explozí, nebo energie samotné detonace nebyla pro syntetickou reakci dostatečná. Po útoku byli ošetřeni dva američtí vojáci s lehkými symptomy otravy NPL [38].

### 4.4.3 Farmakokinetika

Ztráty OP během absorpce (inhalační, perkutánní) a transportu na místo účinku jsou výrazné. Především v krevním řečišti dochází k mnoha interakcím mezi NPL a fyziologickými proteiny, které vedou k inaktivaci toxické sloučeniny. Na tomto ději se podílí zejména BChE, a dále také některé karboxylesterasy a fosforylfosfatasy [33]. Právě vyvazující potenciál BChE je možno využít při profylaxi proti otravě NPL (viz kap. 4.4.6.2).

Metabolismus OP probíhá primárně skrze jaterní CYP 450, kde dochází (zejména) k oxidaci jednotlivých látek. To ve většině případů vede ke snížení toxicity, ačkoliv u některých látek se neurotoxický potenciál může paradoxně ještě zvýšit – hovoříme o tzv. letální syntéze (např. oxidace parathionu na paraoxon) [39]. Hydrofilní meziproducty jsou pak v dalším kroku konjugovány s endogenními kyselinami a z organismu vyloučeny.

Z hlediska distribuce představuje další problém možné ukládání OP (zejména somanu) do tukové tkáně, odkud se může později znovu vyplavit [33].

### 4.4.4 Účinky

Mechanismus účinku NPL spočívá v ireverzibilní blokaci esteratického centra AChE. Na rozdíl od karbamátů je vazba OP-AChE přirozenou cestou prakticky nehydrolyzovatelná, a navíc blokováný enzym podléhá tzv. stárnutí (dealkylaci). Stárnutí AChE je chemický proces, při kterém se mění struktura inhibovaného proteinu a po kterém již je enzym nemožné reaktivovat (viz kap. 4.4.5.2). Rychlost dealkylace je pro různé NPL odlišná – zatímco AChE inhibovaná somanem stárne v horizontu minut, u otravy látkou VX k tomuto ději dochází až v řádu dnů.

Obecné vztahy mezi strukturou a účinkem zahrnují vyšší toxicitu derivátů kyseliny fosfonové ve srovnání s deriváty kyseliny fosforečné. V praxi důležitá je také skutečnost, že molekuly substituované kyslíkem jsou nebezpečnější než sírné deriváty (např. paraoxon >> parathion). Konečně se nebezpečnost jednotlivých látek liší dle substituentu bezprostředně navázaného na centrálním atomu fosforu – fluoroderiváty jsou nebezpečnější než molekuly s nitrilovou skupinou.

Toxicita NPL pro člověka velmi úzce souvisí s branou vstupu do organismu. V případě inhalace OP je střední smrtelná dávka výrazně nižší než při intoxikaci perkutánní. Z hlediska jednotlivých skupin je patrná vyšší účinnost V-látek, která se pohybuje o řád výše než toxicita G-látek [33].

Účinky způsobené inhibicí AChE se dají rozdělit do tří základních skupin:

### **1. Akutní cholinergní krize**

Do této kategorie patří bezprostřední následky akumulace ACh na synapsích a nervosvalové ploténce. Hyperstimulace muskarinových receptorů vede ke zvýšení sekrece žláz (slinných, slzných, potních, bronchiálních); k bronchokonstrikci; k poruchám akomodace a mióze; ke zvýšení peristaltiky až kolikovitým bolestem; a také k bradykardii a hypotenzi. Nikotinové příznaky se projeví především křečemi kosterních svalů. Centrální následky intoxikace NPL zahrnují neklid, emoční labilitu, deprese, závratě či poškození regulačních center v prodloužené míše. Život zasažených ohrožuje zejména kombinace zúžení bronchů, křečí dýchacích svalů a deprese respiračního centra, která v součtu způsobují zástavu dechu a exitus. Smrt se bez adekvátní terapie dostavuje do půl hodiny.

V dnech, týdnech a měsících následujících po akutní otravě NPL diagnostikujeme u pacientů závažnou metabolickou nerovnováhu, která je následkem dlouhodobé hypoxie a acidózy. Z jednotlivých příznaků přetrvávají zejména ty centrální, tedy poruchy spánku, únavnost a deprese; časté jsou také poruchy kognitivních funkcí [33].

### **2. Intermediální syndrom**

Jako samostatný syndrom bývá někdy označována svalová slabost v ramenou, krčních svalech a stehnech, která se manifestuje několik týdnů po intoxikaci [33].

### **3. Pozdní neurotoxický syndrom**

Tento stav se může po několika dnech až týdnech od akutní otravy vyskytnout zhruba u třetiny postižených osob. Dokumentován byl i u lidí, u kterých samotná akutní cholinergní krize diagnostikována nebyla. Jedná se o syndrom, jenž je morfologicky způsoben degenerací koncových částí neuronů. Projevuje se nejprve poruchami čítí a svalové koordinace. Následuje týden až měsíc latence, po které se může vyskytnout fáze tzv. cholinergního dráždění, charakterizovaná zvýšenou sekrecí bronchiálních a slzných žláz a také záněty horních cest dýchacích. Souběžně se vyskytují charakteristické křeče lýtkových svalů, které se postupně vyvinou až v úplnou ztrátu pohybu, ačkoliv sensorické čítí postiženo není. Obrna postupuje od prstů končetin proximálně. Po zhruba osmi týdnech přichází stadium denervace a postupné atrofie svalů nohou i rukou. Tento proces trvá mezi čtvrt a půl rokem. Pozdní neurotoxický syndrom je reparovatelný, ale terapie je mnohaletá a velmi komplikovaná [33].

#### 4.4.4.1 Nespecifické účinky

Kromě účinků přímo spojených s inhibicí AChE vykazují NPL také tzv. nespecifické účinky. Z akutních k nim patří zejména poškození nervové tkáně, které má molekulární příčinu ve stimulaci NMDA receptorů. Jejich aktivace vede k akumulaci vápenatých iontů v neuronech a následnému odumírání nervových buněk. Následky těchto dějů mohou být patrné i několik let po akutní expozici NPL a spolupodílejí se na pozdním neurotoxic-kém syndromu (viz kap. 4.4.4).

Některé z nespecifických účinků se manifestují až později po intoxikaci. Mezi nejčastější patří spuštění stresogenní odpovědi organismu, mezi ty nejzávažnější pak zásah do metabolismu DNA a proteinů, který se může projevit až mutagenními, hepatotoxickými a také imunosupresivními následky.

Důležitou, ale dosud dostatečně neprobádanou oblastí jsou symptomy doprovázející dlouhodobé vystavení nízkým dávkám AChEI. Výzkum těchto potíží se rozběhl především kvůli zdravotním komplikacím veteránů války v Perském zálivu (také viz kap. 4.3.3) [33].

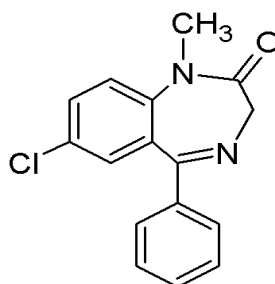
#### 4.4.5 Terapie

Před samotnou léčbou otravy NPL je samozřejmě nutné intoxikované osoby rozpoznat. Jednou z variant je detekce otravných látek přímo v ovzduší, ale tento přístup vyžaduje speciální přístroje. Daleko jednodušším způsobem je zhodnocení klinického stavu potenciálně postižených osob. Nejdříve se projevují poruchy zraku, dechová tíseň a zvracení. Z laboratorních metod se používá stanovení krevních cholinesteras, ať již plazmatické BChE nebo erytrocytární AChE – snížená aktivita poukazuje na intoxikaci buď OP, nebo karbamáty. Tento test klasifikuje závažnost otravy do čtyř kategorií (Tab. 1). Z méně specifických vyšetření může o otravě vypovídat také např. zvýšená aktivita jaterních aminotransferas. Potvrzení diagnózy pak představuje buď test reaktivovatelnosti cholinesteras (který odliší otravu karbamáty a OP) či stanovení metabolitů NPL v tělních tekutinách.

Tabulka 1 Klasifikace otrav OP [33]

<i>Aktivita AChE</i>	<i>Stupeň otravy</i>
Více než 70 %	Latentní forma otravy
70–50 %	Lehká forma otravy
50–30 %	Středně těžká forma otravy
30 % a méně	Těžká (až smrtelná) forma otravy

Vzhledem k rychlosti a závažnosti otrav NPL je třeba co nejdříve po expozici poskytnout antidotní léčbu. Ta by měla zahrnovat jak léčbu příznaků (funkční terapie), tak i obnovu aktivity AChE (kauzální terapie). Vedle antidotní terapie pacientům poskytujeme také léčbu doprovodnou. Kromě aplikace antikonvulziv (v AČR je užíván i. m. diazepam) pro zabránění křečí svalů (především dýchacích) je relativně častou také podpora dýchání (farmakologická, oxygenoterapie) či podání centrálních stimulancií (kofein, efedrin) [33].

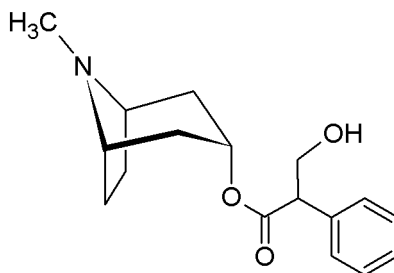


**diazepam**

#### **4.4.5.1 Funkční terapie**

Jelikož za akutní příznaky otravy NPL je zodpovědné nefyziologické množství ACh na synapsích a nervosvalové ploténce, lékem volby pro postiženou osobu jsou logicky parasymptolytika.

Nejrozšířenějším lékem v této indikaci je celosvětově atropin, který působí především na muskarinových receptorech, nikotinové prakticky neovlivňuje. Také centrální symptomy jsou ovlivněny méně, jelikož lék hůře přechází z oběhu do CNS. Atropin se podává injekčně (i. v., i. m.) po 2–4 mg v půlhodinových intervalech; souhrnná dávka může dosáhnout až 100 mg za den. Dovolují-li to podmínky, je vhodné atropin podávat intravenózně.



**atropin**

U otrav s výraznou centrální manifestací je možné k atropinu přidat i centrálně působící anticholinergikum. V AČR je pro tyto účely využíván benaktysin; dobrých výsledků dosahují také např. biperiden či skopolamin [33].



#### 4.4.5.2 Kauzální terapie

Pro obnovu funkce AChE se dnes používají tzv. reaktivátory AChE. Jedná se o kvarterní oximy, které nukleofilně atakují atom fosforu a vyvážou tak OP z vazby na AChE (Schéma 3). Nejstarším zástupcem této skupiny je monokvarterní pralidoximchlorid, dnes se v praxi setkáme spíše s oximy biskvarterními. Ty sice velmi špatně pronikají do CNS, ale mohou reagovat hned se dvěma molekulami AChE a enzym tak reaktivují efektivněji (zejména na nervosvalové ploténce) [24]. Účinnost oximů závisí především na rychlosti stárnutí enzymu (viz kap. 4.4.4) – proto je intoxikace somanem považována za nejhůře léčitelnou, zatímco AChE inhibovaná látkou VX je reaktivovatelná relativně snadněji.

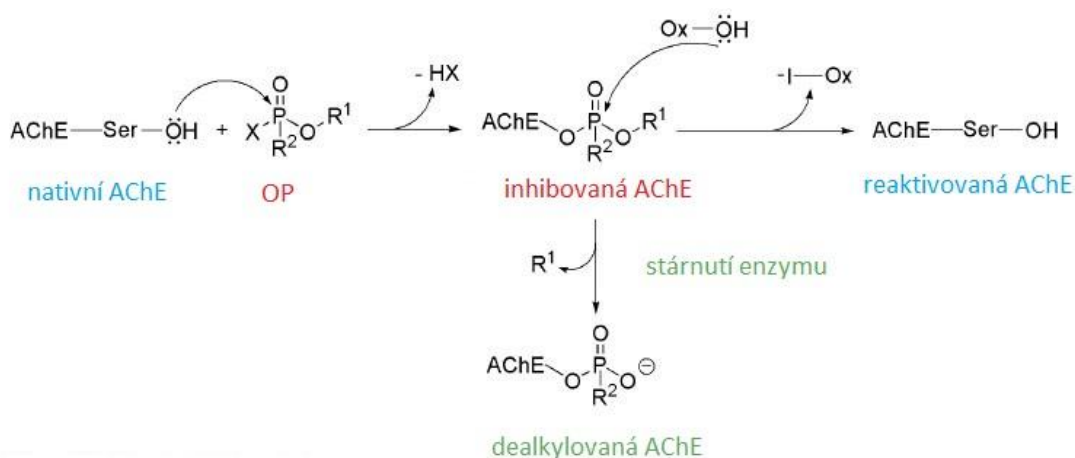
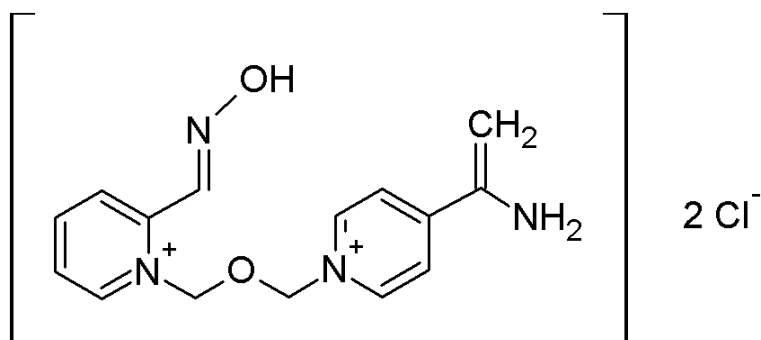


Schéma 3 Reaktivace AChE [57]

V AČR se můžeme setkat s methoximem či ještě účinnějším asoximem (syn. *HI-6*) [33]. Ani zmíněné sloučeniny však nevykazují dostatečnou reaktiváční schopnost, a tak v této oblasti probíhá i nadále intenzivní výzkum. Do budoucna se plánuje zavedení ještě efektivnějších sloučenin – např. tzv. K-oximů [40] [41]. Další možností, jak terapii zefektivnit, je také zavedení solí s lepším farmakologickým profilem (např. asoximdimethansulfonátu místo užívaného dichloridu) [42].



asoxim-dichlorid

#### 4.4.6 Profylaxe

Navzdory zmíněným možnostem terapie otravy OP je prognóza postižených osob špatná [33]. Proto se stále více dostává do popředí otázka účinné profylaxe.

Prvním stupněm ochrany proti působení OP je protichemická ochrana. Jedná se využití prostředků individuální ochrany (PIO), kterými by měl být vybaven každý voják. Tyto prostředky zahrnují ochrannou masku (slouží k prevenci pokožky obličeje a sliznic dýchacích cest) a ochranný oděv chránící zbytek těla. V případě včasné detekce přítomnosti NPL zabrání nasazení PIO intoxikaci beze zbytku.

V případě, že ke kontaminaci pokožky dojde, jsou armádním jednotkám k dispozici odmořovací činidla, která na svůj velký vnitřní povrch chemikálii naváží (v AČR je užíván mikronizovaný bentonit) [33].

Dnes nejpokročilejší přístup k profylaxi využívá farmakologických postupů (farmakologická profylaxe). Cílem je minimalizovat projevy případné otravy a naopak maximalizovat efekt následné terapie. Z mechanismu účinku NPL vyplynuly tři základní směry tohoto typu profylaxe.

##### 4.4.6.1 *Reaktivátory AChEI*

Podání reaktivátorů (viz kap. 4.4.5.2) pre-expozičně vychází ze snahy dosáhnout dostatečné hladiny oximu v krvi již při prvním průniku NPL do oběhu. Dvěma překážkami jsou pro tuto metodu jednak relativně krátký poločas oximů v krvi a jednak nemožnost podat reaktivátory perorálně (vzhledem k jejich chemické povaze jsou již v GIT rozkládány). Elegantní řešení obou problémů představuje transdermální aplikace oximu, která zajišťuje dlouhodobé uvolňování i dostatečný průnik do centrálního kompartmentu. Dnes se můžeme setkat s profylaktiky využívajícími asoxim jak v AČR, tak i např. v Armádě Slovenské Republiky [3].

#### 4.4.6.2 Scavengery

Scavengery (nebo v češtině užívaný termín „vychytávače“) jsou proteiny, které vykazují výraznou afinitu k molekule OP a tím snižují množství toxické látky, která se dostane na cílové místo – synapsi, resp. nervosvalovou ploténku. Funkci bioscavengeru (přirozeného scavengeru) v lidském organismu plní BChE (viz kap. 4.2.4). I v laboratorních testech vykázaly nejlepší výsledky enzymy z rodiny cholinesteras [43].

Z hlediska účinku má nejvyšší potenciál BChE extrahovaná z lidské plazmy. Pro izolaci z biologického materiálu jsou však fyziologická množství tohoto enzymu příliš nízká. Využívají se proto metody využívající moderních biotechnologických metod, díky kterým by bylo možné dostatečná množství izolovat z mléka transgenně upravených zvířat [21]. Dalším možným zdrojem cholinesteras jsou také transgenní rostliny, např. modifikovaná rajčata [44].

Ačkoliv tento způsob profylaxe zatím nebyl uveden do široké praxe, do budoucna by se mohl stát jedním z klíčových přístupů v problematice ochrany proti NPL.

#### 4.4.6.3 Reverzibilní AChEI

Nejrozšířenější přístup profylaxe využívá rozdílných vlastností reverzibilních a ireverzibilních AChEI. Zatímco komplex OP-AChE je prakticky nehydrolyzovatelný a organismus jej ve velké míře nedokáže odbourat, reverzibilní inhibitory blokuje enzym jen dočasně, a navíc je takto blokovaný enzym vůči OP inertní [45]. Nejlepších profylaktických výsledků dosáhly karbamáty fysostigmin a především pyridostigmin, který je celosvětově používán dodnes. Testovány byly i další sloučeniny, např. huperzin A [46] či ketamin [47]. Kromě dostatečné intenzity inhibice cholinesteras je vhodné, aby profylaktikum selektivně inhibovalo AChE, a nikoliv také BChE. Taková sloučenina totiž zablokuje AChE, čímž jí ochrání před intoxikací OP, ale zároveň relativně zachová hladiny fyziologické BChE, která pak může působit jako bioscavenger (viz kap. 4.4.6.2).

Co se týče pyridostigminu, existuje přímá úměra mezi podanou dávkou a profylaktickými účinky, ale také mezi podanou dávkou a výskytem nežádoucích účinků. Tyto jsou analogické ke klinickým symptomům otravy NPL (vyplývají ze stejného mechanismu působení), ale ve výrazně nižším rozsahu [48]. Úspěšnou metodou, jak zvýšit dávku profylaktika a vyhnout se přitom výskytu vedlejších účinků, se ukázalo být podání pyridostigminu společně s centrálně působícími anticholinergiky. Tato kombinace umožnila zvýšit užívanou dávku o 17 %, a tím zlepšit účinnost, ale zároveň i snášenlivost pyridostigminu [49]. V současnosti se tak ve výbavě českých vojáků nachází vícesložkový přípravek, který kromě pyridostigminu obsahuje také benaktyzin a trihexyfenidyl, jež se nachází v samostatné tabletě.

Bohužel, i přesto přetrvávají pochybnosti o dlouhodobém užívání pyridostigminu, byť v nízkých dávkách (viz kap. 4.3.3). Proto je důležité i nadále hledat nové, účinnější a bezpečnější AChEI.

#### **4.4.6.4 Možnosti do budoucna**

Vedle zdokonalení zmíněných metod se do budoucna uvažuje o možnostech, které skýtá moderní genová terapie. Zatím nejslibnější se zdají být vektory zvyšující hladiny paraoxonasy PON1. Tato esterasa totiž dokáže hydrolyzovat molekulu OP a tím jeho toxicitu eliminovat. Další možnou cestou by pak byly úseky DNA kódující monoklonální protilátky specificky vychytávající NPL [48].

## 5 Praktická část

### 5.1 Syntéza

Příprava všech látek probíhala podle obecného schématu:

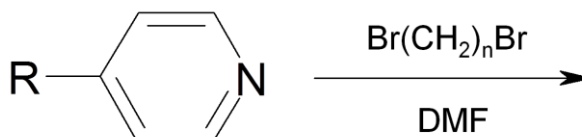


Schéma 4 Obecná syntetická reakce

Substituovaný pyridin reagoval s alkylendibromidem v prostředí dimethylformamidu (DMF) za různých teplot. Reagencie i rozpouštědla používané během práce byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Průběh reakcí byl sledován tenkovrstvou chromatografií (TLC), kdy byl vzorek z reakční baňky porovnáván s výchozí sloučeninou. Jako stacionární fáze byla použita celulóza (Cellulose F254, Merck), chromatogram byl vyvíjen směsí butanol:voda:kyselina octová v poměru 5:2:1. Detekce probíhala jednak pod UV lampou při vlnové délce 254 nm a jednak vizuálně po postřiku Dragendorfovým činidlem.

Po ukončení reakce byla reakční směs převrstvena acetonem, resp. etherem, a zchlazena v lednici při 5 °C. Následovala fáze přečišťování, po které byla totožnost látek kontrolována NMR-analýzou (spektra <sup>1</sup>H měřená při 299,95 MHz a <sup>13</sup>C měřená při 75,43 MHz na přístroji Varian Mercury-VxBB 300 spectrometer) a hmotnostní spektrometrií (ESI-MS spektra měřená na přístroji HP1100 HPLC). U látek krystalického charakteru byla také stanovena teplota tání (na bodotávku PHMK 05; hodnoty nebyly korigovány) a provedena elementární analýza (s využitím přístroje EA 1110 CHNS instrument).

Sloučeniny s potvrzenou totožností byly uchovávány v lednici při 4–7 °C. Pak byly změřeny jednotlivé inhibiční potenciály (viz kap. 5.2).

### 5.1.1 Hydrofilní série

Biskvarterní sloučeniny s hydroxypropylovým postranním řetězcem se pro přípravu ukázaly jako nejsnazší. Po úvodní reakci 3-hydroxypropylpyridinu (0,5g; odpovídá 3,64 mmol) s alkylendibromidem (1,64 mmol) v DMF (10 ml) probíhající při 60 °C byla reakční směs v baňce převrstvena 80 ml acetonu a ponechána přes noc v lednici. Další den byla směs přefiltrována za sníženého tlaku a ještě dvakrát promyta 10 ml acetonu. Pak byly baňky ponechány při laboratorní teplotě několik hodin, aby vytěkaly i poslední zbytky acetonu. Následovalo vymytí výchozích látek, meziproductů a balastu vroucím ethyl-acetátem (50 ml), u látek s kratším spojovacím řetězcem také vroucím acetonitrilem (50 ml).

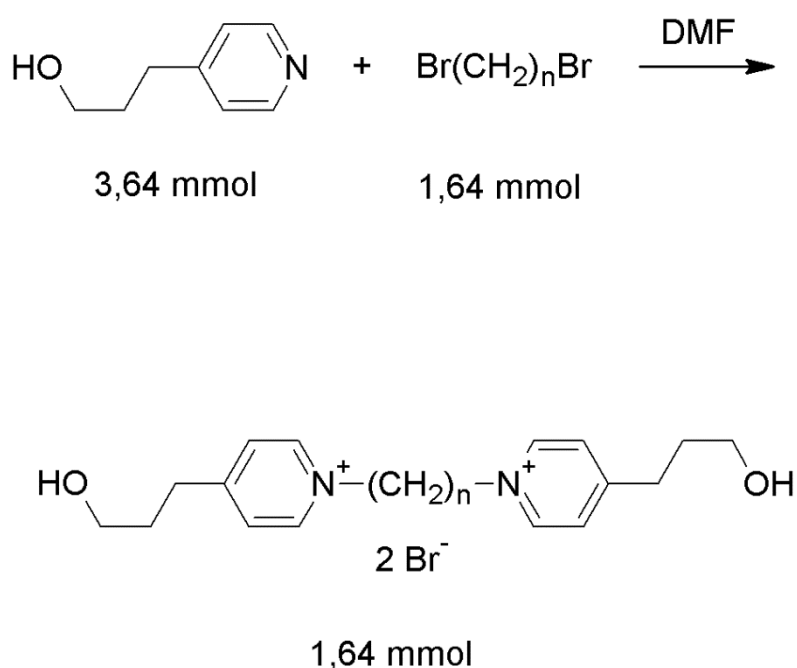
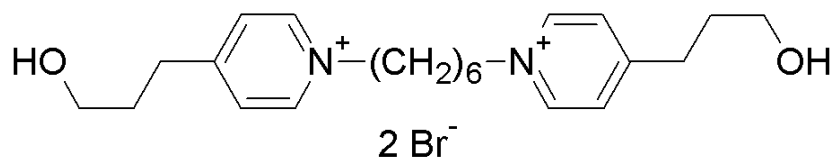


Schéma 5 Reakce hydrofilních inhibitorů

### 5.1.1.1 Hex-1,6-diyl-bis[4-(3-hydroxypropyl)pyridinium]-dibromid (1)



Sloučenina **1** byla po promytí ethyl-acetátem promyta také acetonitrilem.

Délka trvání reakce 29 h  
Výtěžek 34 %  
Teplota tání 124–128 °C

#### **NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 9.00 (d, 4H,  $J = 5.6$  Hz, H – 2, 2', 6, 6'), 8.02 (d, 4H,  $J = 5.6$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.55 (t, 4H,  $J = 7.3$  Hz, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 3.43 (t, 4H,  $J = 6.4$  Hz, -CH<sub>2</sub>-OH), 2.92 (t, 4H,  $J = 7.5$  Hz, HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.93-1.77 (m, 8H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.38-1.20 (m, 4H, N<sup>+</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 162.43, 143.79, 127.52, 59.49, 32.10, 31.42, 30.12, 24.57.

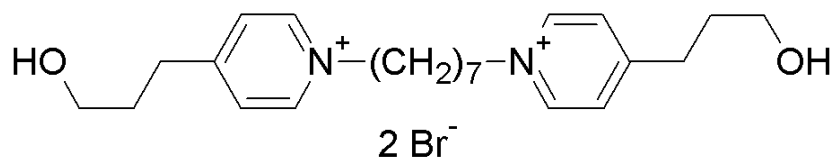
#### **ESI-MS:**

$m/z$  357.26 [M-H]<sup>+</sup> (kalkulováno pro [C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 357.23).

#### **EA:**

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<i>Vypočítané hodnoty (%)</i>	50,98	6,61	5,40
<i>Naměřené hodnoty (%)</i>	50,65	7,04	5,58

### 5.1.1.2 Hept-1,7-diyl-bis[4-(3-hydroxypropyl)pyridinium]-dibromid (2)



Sloučenina **2** byla po promytí ethyl-acetátem promyta také acetonitrilem.

Délka trvání reakce 29 h

Výtěžek 35 %

Teplota tání neměřena, sloučenina měla amorfni strukturu

#### **NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 9.00 (d, 4H,  $J = 5.6$  Hz, H – 2, 2', 6, 6'), 8.02 (d, 4H,  $J = 5.6$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.55 (t, 4H,  $J = 7.3$  Hz, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 3.43 (t, 4H,  $J = 6.4$  Hz, -CH<sub>2</sub>-OH), 2.92 (t, 4H,  $J = 7.5$  Hz, HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.94-1.76 (m, 8H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.38-1.19 (m, 6H, N<sup>+</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 162.45, 143.78, 127.56, 59.66, 59.51, 32.11, 31.44, 30.32, 27.60, 24.99.

#### **ESI-MS:**

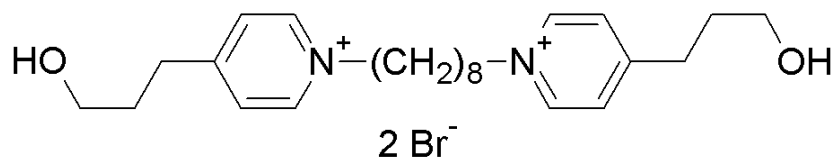
$m/z$  371.28 [M-H]<sup>+</sup> (kalkulováno pro [C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 371.22).

#### **EA:**

Neměřena (amorfní struktura).



### 5.1.1.3 Okt-1,8-diyl-bis[4-(3-hydroxypropyl)pyridinium]-dibromid (3)



Délka trvání reakce 20 h  
Výtěžek 36 %  
Teplota tání 178–180 °C

#### **NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 9.02 (d, 4H,  $J = 6.6$  Hz, H – 2, 2', 6, 6'), 8.03 (d, 4H,  $J = 6.6$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.56 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 3.43 (t, 4H,  $J = 6.2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-OH), 2.92 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.92-1.77 (m, 8H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.30-1.18 (m, 8H, N<sup>+</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 162.43, 143.93, 127.61, 59.66, 59.51, 32.13, 31.43, 30.46, 28.05, 25.18.

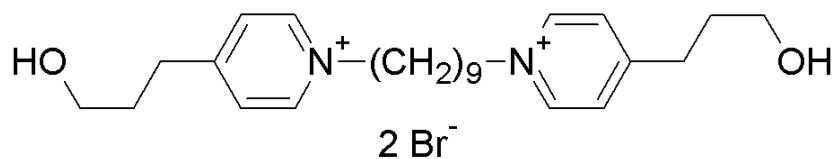
#### **ESI-MS:**

m/z 385.29 [M-H]<sup>+</sup> (kalkulováno pro [C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 385.25).

#### **EA:**

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<i>Vypočítané hodnoty (%)</i>	52,76	7,01	5,13
<i>Naměřené hodnoty (%)</i>	52,38	7,39	5,24

#### 5.1.1.4 Non-1,9-diyl-bis[4-(3-hydroxypropyl)pyridinium]-dibromid (4)



Délka trvání reakce 124 h  
Výtěžek 44 %  
Teplota tání 149–151 °C

#### **NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 9.01 (d, 4H,  $J = 6.7$  Hz, H – 2, 2', 6, 6'), 8.03 (d, 4H,  $J = 6.6$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.55 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 3.43 (t, 4H,  $J = 6.23$  Hz, -CH<sub>2</sub>-OH), 2.91 (t, 4H,  $J = 7.5$  Hz, HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.91-1.77 (m, 8H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.31-1.18 (m, 10H, N<sup>+</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 162.44, 143.80, 127.57, 59.72, 59.51, 32.14, 31.44, 30.49, 28.45, 28.19, 25.26.

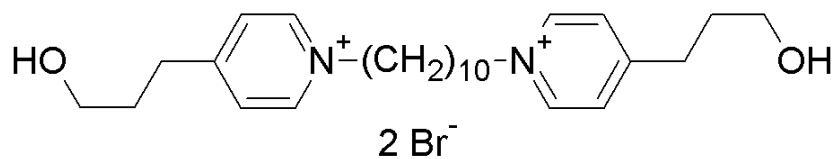
#### **ESI-MS:**

m/z 399.31 [M-H]<sup>+</sup> (kalkulováno pro [C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 399.22).

#### **EA:**

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<i>Vypočítané hodnoty (%)</i>	53,58	7,19	5,00
<i>Naměřené hodnoty (%)</i>	53,35	7,58	5,19

### 5.1.1.5 Dec-1,10-diyl-bis[4-(3-hydroxypropyl)pyridinium]-dibromid (5)



Délka trvání reakce 124 h  
Výtěžek 51 %  
Teplota tání 169–171 °C

#### **NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 9.02 (d, 4H,  $J = 6.6$  Hz, H – 2, 2', 6, 6'), 8.03 (d, 4H,  $J = 6.6$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.56 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 3.43 (t, 4H,  $J = 6.2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-OH), 2.95-2.87 (m, 4H, HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.94-1.75 (m, 8H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.32-1.15 (m, 12H, N<sup>+</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 162.43, 143.81, 127.57, 59.71, 59.51, 32.14, 31.43, 30.53, 28.58, 28.26, 25.29.

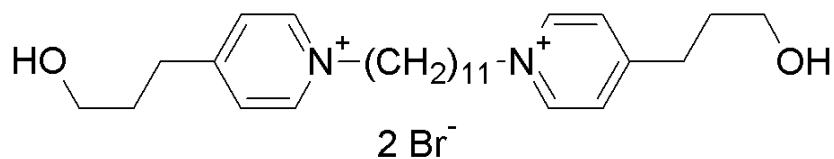
#### **ESI-MS:**

$m/z$  413.32 [M-H]<sup>+</sup> (kalkulováno pro [C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 413.29).

#### **EA:**

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<i>Vypočítané hodnoty (%)</i>	54,36	7,37	4,88
<i>Naměřené hodnoty (%)</i>	53,99	7,60	5,06

### 5.1.1.6 Undec-1,11-diyl-bis[4-(3-hydroxypropyl)pyridinium]-dibromid (6)



Délka trvání reakce 124 h  
Výtěžek 47 %  
Teplota tání 116–120 °C

#### **NMR:**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 9.01 (d, 4H,  $J = 6.7$  Hz, H – 2, 2', 6, 6'), 8.03 (d, 4H,  $J = 6.6$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.55 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{N}^+-\text{CH}_2$ ), 3.43 (t, 4H,  $J = 6.21$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ), 2.91 (t, 4H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2$ ), 1.95-1.74 (m, 8H,  $\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ,  $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1.34-1.14 (m, 14H,  $\text{N}^+-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_7$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 162.43, 143.81, 127.57, 59.73, 59.51, 32.15, 31.44, 30.53, 28.72, 28.67, 28.31, 25.31.

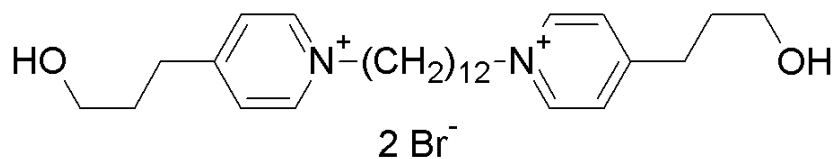
#### **ESI-MS:**

$m/z$  427.34  $[\text{M}-\text{H}]^+$  (kalkulováno pro  $[\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_2]^+$  427.34).

#### **EA:**

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<i>Vypočítané hodnoty (%)</i>	55,11	6,61	5,40
<i>Naměřené hodnoty (%)</i>	54,90	6,98	5,52

### 5.1.1.7 Dodec-1,12-diyl-bis[4-(3-hydroxypropyl)pyridinium]-dibromid (7)



Délka trvání reakce 124 h  
Výtěžek 41 %  
Teplota tání 107–110 °C

#### **NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 9.00 (d, 4H,  $J = 6.7$  Hz, H – 2, 2', 6, 6'), 8.03 (d, 4H,  $J = 6.6$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.55 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 3.43 (t, 4H,  $J = 6.2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-OH), 2.92 (t, 4H,  $J = 7.5$  Hz, HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.95-1.75 (m, 8H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.33-1.13 (m, 16H, N<sup>+</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>):

δ (ppm) 162.43, 143.80, 127.57, 59.74, 59.51, 32.14, 31.44, 30.52, 28.80, 28.71, 28.32, 25.31.

#### **ESI-MS:**

$m/z$  441.35 [M-H]<sup>+</sup> (kalkulováno pro [C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 441.37).

#### **EA:**

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<i>Vypočítané hodnoty (%)</i>	55,82	7,70	4,65
<i>Naměřené hodnoty (%)</i>	55,60	8,11	4,87

### 5.1.2 Lipofilní série

Syntéza látek odvozených od ethyl-isonikotinátu probíhala analogicky, ale s několika úpravami. Ethylester kyseliny isonikotinové (0,5g; odpovídá 3,31 mmol) reagoval s alkylendibromidem (1,49 mmol) v DMF (10 ml), ale v některých případech při vyšších teplotách (70 °C, 75 °C). Následně byla reakční směs v baňce převrstvena etherem a ponechána v chladu přes noc. Kapalina nad sraženinou byla odlita. Reakční směs byla promyta vroucím ethyl-acetátem (10 ml) a nakonec byl do baňky přidán aceton (5 ml), směs byla protřepána a poté aceton se zbytky nečistot odfiltrován.

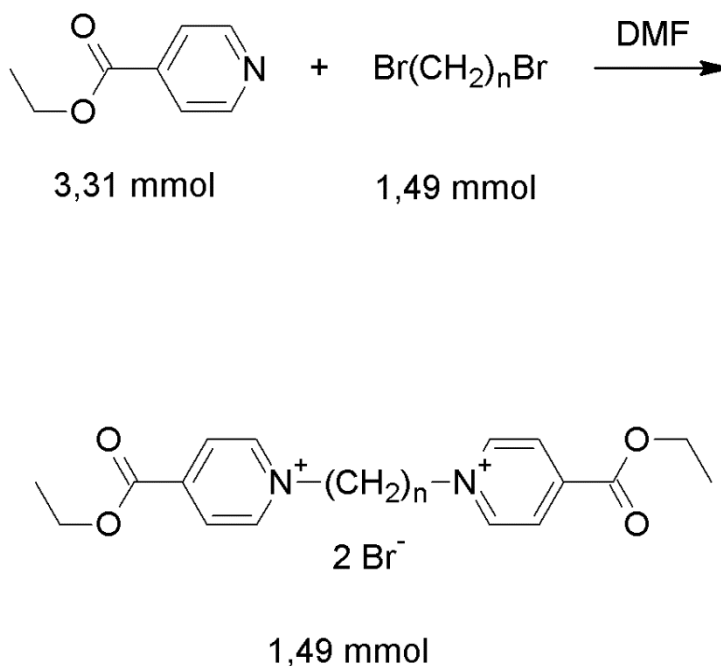
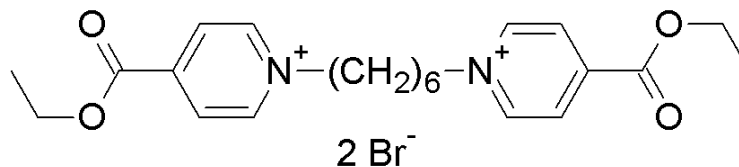


Schéma 6 Reakce lipofilních inhibitorů

### 5.1.2.1 Hex-1,6-diyl-bis(4-ethoxykarbonylpyridinium)-dibromid (8)



Délka trvání reakce	80 h (70 °C)
Výtěžek	17 %
Teplota tání	neměřena, sloučenina měla amorfní strukturu

#### **NMR:**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 9.42-9.35 (m, 4H, H – 2, 2', 6, 6), 8.51 (d, 4H,  $J = 6.4$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.79-4.70 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2$ ), 4.48-4.40 (m, 4H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2$ ), 1.99-1.88 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1.41-1.27 (m, 10H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $\text{N}^+-(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 162.00, 146.21, 143.77, 127.08, 62.87, 34.13, 30.34, 27.68, 24.53.

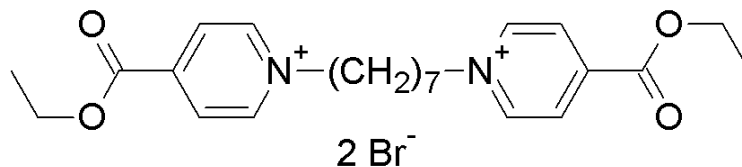
#### **ESI-MS:**

$m/z$  385.22  $[\text{M}-\text{H}]^+$  (kalkulováno pro  $[\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4]^+$  385.24).

#### **EA:**

Neměřena (amorfní struktura).

### 5.1.2.2 Hept-1,7-diyl-bis(4-ethoxykarbonylpyridinium)-dibromid (9)



Délka trvání reakce 26 h (60 °C)  
Výtěžek 20 %  
Teplota tání neměřena, sloučenina měla amorfni strukturu

#### **NMR:**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 9.32 (m, 4H, H – 2, 2', 6, 6'), 8.52 (d, 4H,  $J = 6.2$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.73 – 4.68 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2$ ), 4.47-4.41 (m, 4H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2$ ), 1.96-1.88 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1.41-1.23 (m, 12H,  $\text{N}^+-\text{(CH}_2)_2-\text{(CH}_2)_3$ ,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 161.99, 146.15, 143.81, 127.12, 62.85, 34.20, 31.94, 30.62, 28.18, 25.07.

#### **ESI-MS:**

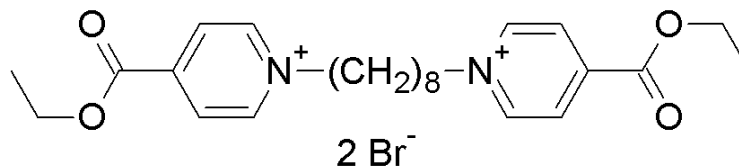
$m/z$  399.24  $[\text{M}-\text{H}]^+$  (kalkulováno pro  $[\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4]^+$  399.11).

#### **EA:**

Neměřena (amorfní struktura).



### 5.1.2.3 Okt-1,8-diyl-bis(4-ethoxykarbonylpyridinium)-dibromid (10)



Délka trvání reakce 22 h (60 °C) + 24 h (70 °C)  
Výtěžek 15 %  
Teplota tání neměřena, sloučenina měla amorfni strukturu

#### **NMR:**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 9.37-9.29 (m, 4H, H - 2, 2', 6, 6'), 8.52 (d, 4H,  $J = 6.6$  Hz, H - 3, 3', 5, 5'), 4.74-4.68 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2$ ), 4.46-4.41 (m, 4H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2$ ), 1.96-1.88 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1.37 (t, 6H,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 1.31-1.21 (m, 8H,  $\text{N}^+(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_4$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 162.00, 146.17, 143.80, 127.11, 62.87, 34.17, 32.36, 30.68, 28.07, 25.16.

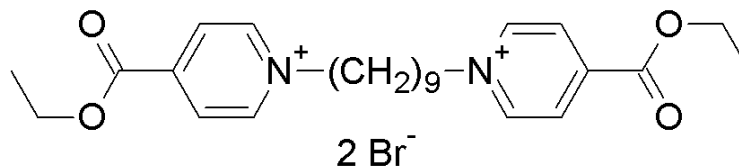
#### **ESI-MS:**

$m/z$  413.25  $[\text{M}-\text{H}]^+$  (kalkulováno pro  $[\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_4]^+$  413.20).

#### **EA:**

Neměřena (amorfní struktura).

#### 5.1.2.4 Non-1,9-diyl-bis(4-ethoxykarbonylpyridinium)-dibromid (11)



Délka trvání reakce 22 h (60 °C) + 24 h (70 °C)

Výtěžek 10 %

Teplota tání 171–174 °C

#### **NMR:**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 9.37-9.28 (m, 4H, H – 2, 2', 6, 6'), 8.52 (d, 4H,  $J = 6.1$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.75-4.67 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2$ ), 4.47-4.40 (m, 4H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2$ ), 1.95-1.87 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1.37 (t, 6H,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 1.31-1.19 (m, 10H,  $\text{N}^+-\text{(CH}_2)_2-\text{(CH}_2)_5$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 161.99, 146.16, 143.79, 127.10, 62.86, 32.40, 30.71, 28.71, 28.47, 28.20, 25.23.

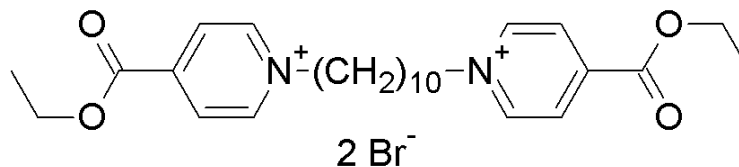
#### **ESI-MS:**

$m/z$  427.27  $[\text{M}-\text{H}]^+$  (kalkulováno pro  $[\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4]^+$  427.25).

#### **EA:**

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<i>Vypočítané hodnoty (%)</i>	51,03	6,17	4,76
<i>Naměřené hodnoty (%)</i>	50,85	6,35	4,52

### 5.1.2.5 Dec-1,10-diyl-bis(4-ethoxykarbonylpyridinium)-dibromid (12)



Délka trvání reakce 21 h (75 °C)

Výtěžek 15 %

Teplota tání 189–193 °C

#### **NMR:**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 9.39-9.28 (m, 4H, H – 2, 2', 6, 6'), 8.52 (d, 4H,  $J = 5.3$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.71 (t, 4H,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2$ ), 4.48-4.40 (m, 4H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2$ ), 1.97-1.86 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1.42-1.33 (m, 6H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 1.32-1.17 (m, 12H,  $\text{N}^+-\text{(CH}_2)_2-\text{(CH}_2)_6$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 161.99, 146.15, 143.79, 127.11, 62.86, 35.17, 32.12, 30.75, 28.61, 28.30, 25.27.

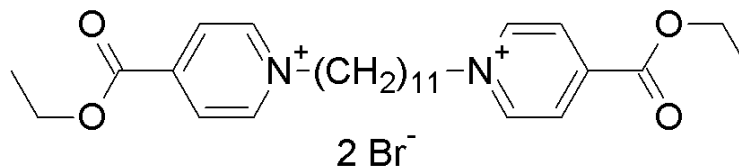
#### **ESI-MS:**

$m/z$  441.28  $[\text{M}-\text{H}]^+$  (kalkulováno pro  $[\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_4]^+$  441.24).

#### **EA:**

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<i>Vypočítané hodnoty (%)</i>	51,84	6,36	4,65
<i>Naměřené hodnoty (%)</i>	51,67	6,64	4,48

### 5.1.2.6 Undec-1,11-diyl-bis(4-ethoxykarbonylpyridinium)-dibromid (13)



Délka trvání reakce 80 h (70 °C)

Výtěžek 22 %

Teplota tání 157–160 °C

#### **NMR:**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 9.37-9.31 (m, 4H, H – 2, 2', 6, 6'), 8.51 (d, 4H,  $J = 6.4$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.75-4.68 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2$ ), 4.47-4.40 (m, 4H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2$ ), 1.95-1.87 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1.37 (t, 6H,  $J = 7.11$  Hz,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 1.31-1.19 (m, 14H,  $\text{N}^+-\text{(CH}_2)_2-\text{(CH}_2)_7$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 161.99, 146.16, 143.78, 127.10, 62.86, 30.75, 28.73, 28.68, 28.32, 25.28.

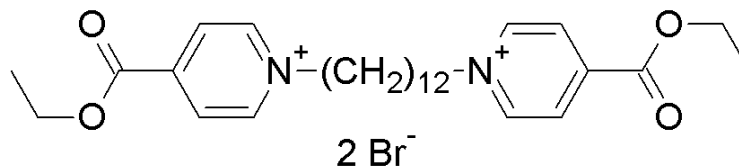
#### **ESI-MS:**

$m/z$  455.30  $[\text{M}-\text{H}]^+$  (kalkulováno pro  $[\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_4]^+$  455.20).

#### **EA:**

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<i>Vypočítané hodnoty (%)</i>	52,61	6,54	4,54
<i>Naměřené hodnoty (%)</i>	52,23	6,85	4,39

### 5.1.2.7 Dodec-1,12-diyl-bis(4-ethoxykarbonylpyridinium)-dibromid (14)



Délka trvání reakce	80 h (70 °C)
Výtěžek	29 %
Teplota tání	neměřena, sloučenina měla amorfni strukturu

#### **NMR:**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 9.37-9.31 (m, 4H, H – 2, 2', 6, 6'), 8.51 (d, 4H,  $J = 6.3$  Hz, H – 3, 3', 5, 5'), 4.75-4.68 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2$ ), 4.47-4.40 (m, 4H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2$ ), 1.96-1.87 (m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1.37 (t, 6H,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 1.30-1.16 (m, 16H,  $\text{N}^+-\text{(CH}_2)_2-\text{(CH}_2)_8$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO  $d_6$ ):

$\delta$  (ppm) 162.01, 146.17, 143.79, 127.11, 62.87, 34.14, 32.43, 30.75, 28.82, 28.73, 28.35, 25.28.

#### **ESI-MS:**

$m/z$  469.31  $[\text{M}-\text{H}]^+$  (kalkulováno pro  $[\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_4]^+$  469.28).

#### **EA:**

Neměřena (amorfní struktura).

## 5.2 *In vitro* testování inhibičních vlastností

K měření aktivity nově nasyntetizovaných inhibitorů byla použita modifikovaná metoda podle Ellmana [50]. Tato kolorimetrická metoda využívá toho, že cholinesterasy rozkládají nejen ACh, ale také acetylthiocholin (ATCh). Odštěpený thiocholin dále štěpí přítomnou kyselinu 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou (DTNB) na rozkladný produkt, jehož koncentrace (resp. jeho mezomeru) je spektrofotometricky změřena (Schéma 7) [51].

Ačkoliv má užití Ellmanovy metody některá omezení, ta jsou kritická především při stanovování aktivit cholinesteras v biologickém materiálu (interference s hemoglobinem, thiolovými skupinami proteinů v plazmě apod.), a v našem *in vitro* experimentu tak metoda mohla být použita [51].

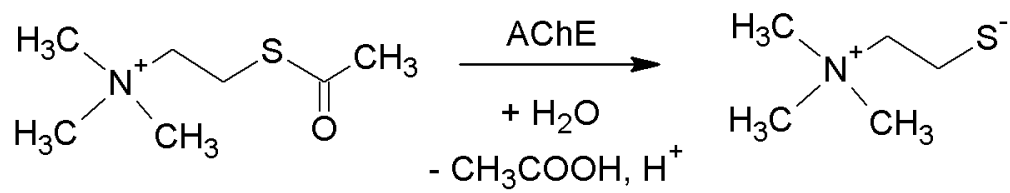
Během měření jednotlivých inhibičních potenciálů byl nejprve připraven roztok lidské rekombinantní AChE nebo lidské plazmatické BChE ve fosfátovém pufru o pH = 7,4 a aktivitě 0,002 U/μl. 5 μl této směsi pak bylo přímo v kyvetě promícháno s 20 μl roztoku DNTB o koncentraci 0,4 mg/ml. Po přidání 5 μl roztoku zkoumaného inhibitoru byla směs ponechána pět minut při laboratorní teplotě, a pak byla samotná rozkladná reakce zahájena přidáním 20 μl 1mM roztoku ATCh ve fosfátovém pufru. Absorbance byla měřena při 412 nm po dobu pěti minut na multikanálovém spektrofotometru Sunrise [52].

Inhibiční potenciál byl stanoven dle vzorce

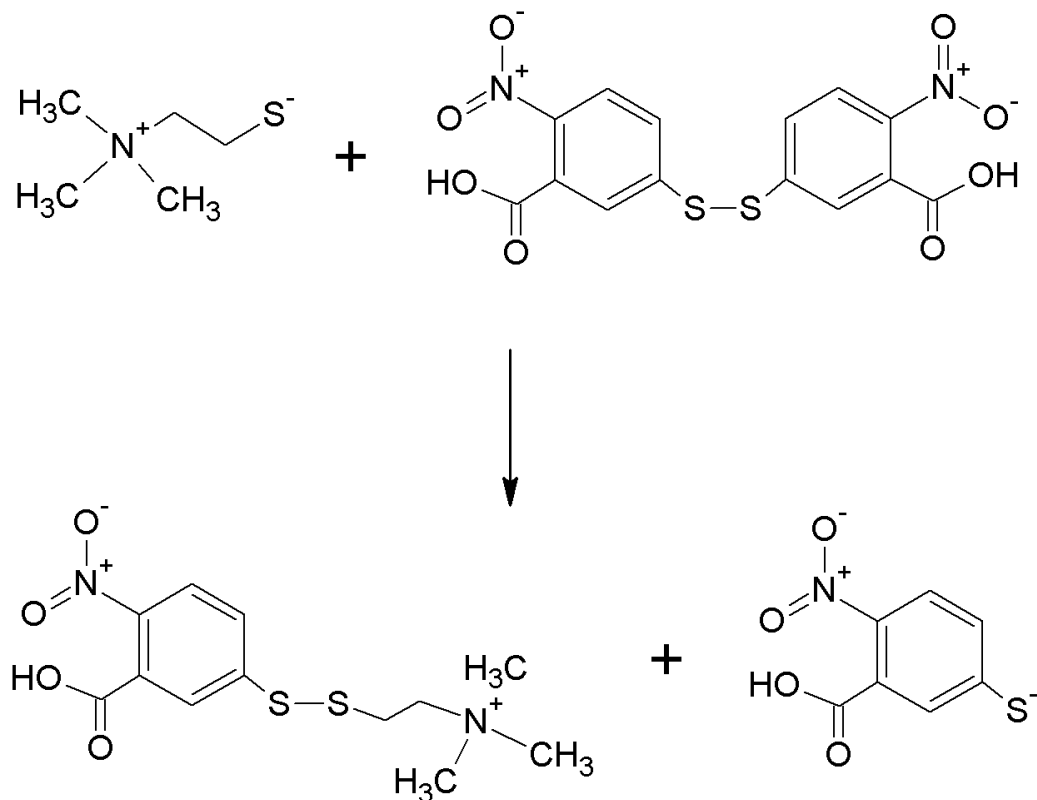
$$I = \left(1 - \frac{\Delta Ax}{\Delta A_0}\right) \times 100,$$

kde  $\Delta Ax$  představuje změnu absorbance u měřeného vzorku a  $\Delta A_0$  změnu absorbance u kontrolního vzorku (místo zkoumané sloučeniny bylo přidáno 5 μl fosfátového pufru).

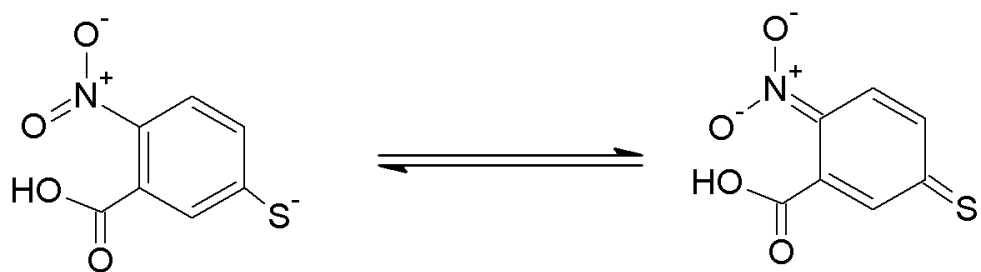
Ke stanovení hodnot  $IC_{50}$  byl použit program Origin 6.1. Procenta inhibice byla vypočítána pomocí Hillova plotu ( $n=1$ ), jiné varianty plotu nebyly optimální a ve srovnání s použitou metodou vykázaly nižší korelační koeficient.



*Krok 1 Rozklad thiocholinu*



*Krok 2 Reakce ATCh s DTNB*



*Krok 3 Mezomerní formy chromoforu*

**Schéma 7 Ellmanova reakce**

## 6 Výsledky

Naměřené  $IC_{50}$  jednotlivých látek jsou zobrazeny v Tabulkách 2, 3. Pro každou látku byla provedena tři měření, udaná hodnota představuje průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou. Kromě údajů pro AChE a BChE je v posledním sloupci vypočítán také index selektivity (SI). Tento údaj je definován jako podíl  $IC_{50}$  pro BChE a AChE a ilustruje tak míru selektivity pro AChE.

Tabulka 2 Inhibiční potenciál hydrofilních inhibitorů

<i>INHIBITOR</i>	<i>Délka spojovacího řetězce</i>	<i><math>IC_{50}</math> AChE [<math>\mu</math>M]</i>	<i><math>IC_{50}</math> BChE [<math>\mu</math>M]</i>	<i>SI</i>
1	6C	23,2 ± 4,5	358 ± 10	15,4
2	7C	12,2 ± 2,4	56 ± 9	4,6
3	8C	7,6 ± 1,5	33,0 ± 5,5	4,3
4	9C	5,0 ± 1,0	18,6 ± 3,1	3,7
5	10C	4,4 ± 0,9	16,3 ± 2,7	3,7
6	11C	2,8 ± 0,5	8,8 ± 1,5	3,1
7	12C	6,4 ± 1,3	8,9 ± 1,5	1,4

Tabulka 3 Inhibiční potenciál lipofilních inhibitorů

<i>INHIBITOR</i>	<i>Délka spojovacího řetězce</i>	<i><math>IC_{50}</math> AChE [<math>\mu</math>M]</i>	<i><math>IC_{50}</math> BChE [<math>\mu</math>M]</i>	<i>SI</i>
8	6C	27,2 ± 5,3	747 ± 125	27,5
9	7C	32,9 ± 6,4	169 ± 28	5,1
10	8C	15,3 ± 3,0	230 ± 38	15,0
11	9C	10,8 ± 2,1	122 ± 20	11,3
12	10C	10,7 ± 2,1	182 ± 30	17,0
13	11C	4,3 ± 0,8	57 ± 10	13,2
14	12C	6,1 ± 1,2	42 ± 7	6,8



## 7 Diskuse

### 7.1 Postup

Postup syntézy jednotlivých látek vycházel z již dříve použité metodiky [53]. U látek bis(hydroxypropylpyridiniové) řady byly jednotlivé sloučeniny tímto způsobem připraveny bez obtíží. Pro molekuly odvozené od ethyl-isonikotinátu byl kvůli jejich odlišnému, výrazně lipofilnějšímu charakteru postup syntézy i přečišťování modifikován:

Jednak reakce probíhaly ve většině případů znatelně menší rychlostí, než u předchozí série; proto syntézy probíhaly buď při stejné teplotě, tedy 60 °C, ale déle (několik dní), nebo byla reakční teplota zvýšena na 70, resp. 75 °C.

Hned další krok, tedy vysrážení produktu a rozpuštění výchozích látek v nadbytku acetonu, se ukázal jako neaplikovatelný. Surový produkt usazený na dně reakční baňky se totiž v acetonu zvolna rozpouštěl. Jeho funkci proto u lipofilních látek převzal ether, vůči kterému byly připravované sloučeniny inertní.

Ani následné promývání ethyl-acetátem nevedlo k uspokojivým výsledkům – inhibitory se v něm sice nerozpouštěly, ale stejně se chovaly také zbytky substrátů a přítomné monokvarterní meziproducty. Dalším zkoušeným rozpouštědlem byl acetonitril, ale v něm se cílové sloučeniny naopak rozpouštěly prakticky okamžitě. Až malá množství acetonu dokázala z produktů vymýt zbytky výchozích látek. Bohužel, vedle substrátů se v acetonu částečně rozpouštěly i samotné produkty, a tím došlo k výraznému snížení výtěžků.

Právě ve fázi přečišťování ztroskotaly i další ze zkoušených strukturních typů látek. U látek odvozených od hydroxypyridinu a hydroxymethylpyridinu byla na vině pravděpodobně amfifilní povaha těchto látek (způsobená blízkostí hydroxylové skupiny k aromatickému jádru a následnou mezomerií). Deriváty odvozené od methyl-isonikotinátu se dočistit nepodařilo nejspíše kvůli relativně nižší lipofilitě než u ethyl-derivátů.

Co se týče kontrolních metod, konkrétně monitorování průběhu reakcí a přečišťování pomocí TLC, byly kromě kombinace celulosa – směs butanolu, vody a kyseliny octové zkoušeny i silikagel (coby pevná fáze) a acetonitril a směsi etanolu a vody (fáze mobilní). Žádná z těchto kombinací však nedosáhla separační účinnosti srovnatelné s původním postupem.

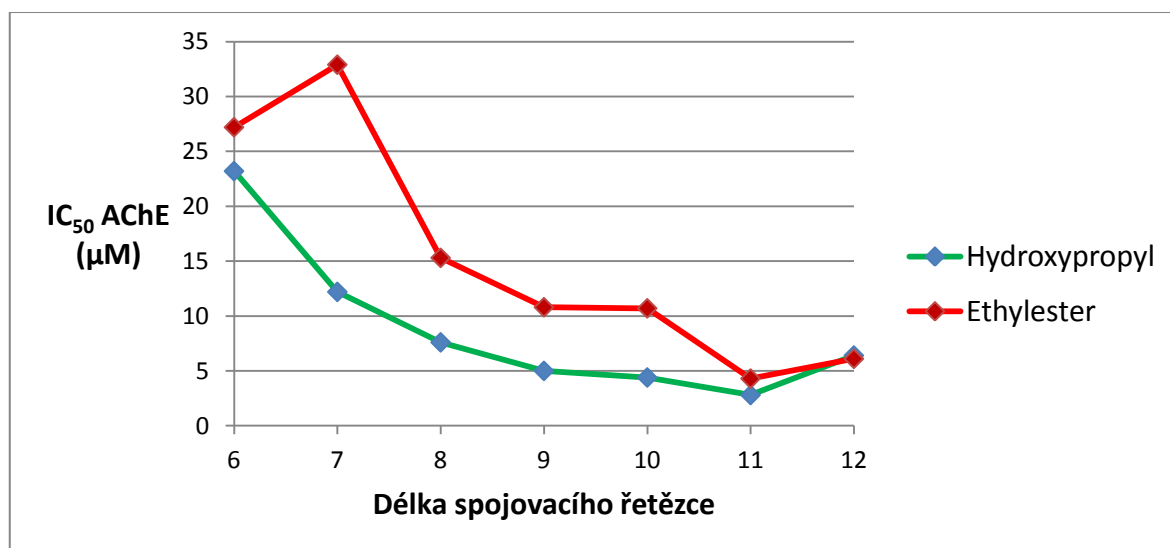
## 7.2 Výsledky

Všechny nesyntetizované sloučeniny vykázaly signifikantní inhibiční potenciál vůči AChE. Naměřené hodnoty jednotlivých inhibitorů jsou uvedeny v Tabulkách 2, 3.

Ze sloučenin s 4-hydroxypropylovým postranním řetězcem dosáhla nejvyššího inhibičního potenciálu vůči AChE sloučenina **6** (s undecylenovým spojovacím řetězcem), nejnižšího sloučenina **1** (s nejkratším, 6-uhlíkatým spojovacím řetězcem). Hodnoty  $IC_{50}$  klesaly s délkou spojovacího článku až po sloučeninu **6** (11C), molekula **7** s dvanáctičlenným alkylenem již vykazovala  $IC_{50}$  vyšší. Selektivita jednotlivých inhibitorů vůči AChE se pohybovala od 1,4 (sloučenina **7**) až po 15,4 (**1**) a s prodlužujícím se spojovacím řetězcem klesala.

U molekul odvozených od ethyl-isonikotinátu vykázala nejvyšší inhibiční potenciál sloučenina **13** s undecylenovým spojovacím řetězcem. Nejslabší byl inhibitor **9**, kde spojovací článek tvoří heptylen. S výjimkou právě sloučeniny **9** klesaly hodnoty  $IC_{50}$  opět s prodlužujícím se spojovacím řetězcem až po jedenáctičlenný alkylen (**13**), o uhlík delší homolog **14** vykazoval  $IC_{50}$  vyšší. Selektivita inhibice vůči AChE byla v této skupině značně variabilní.

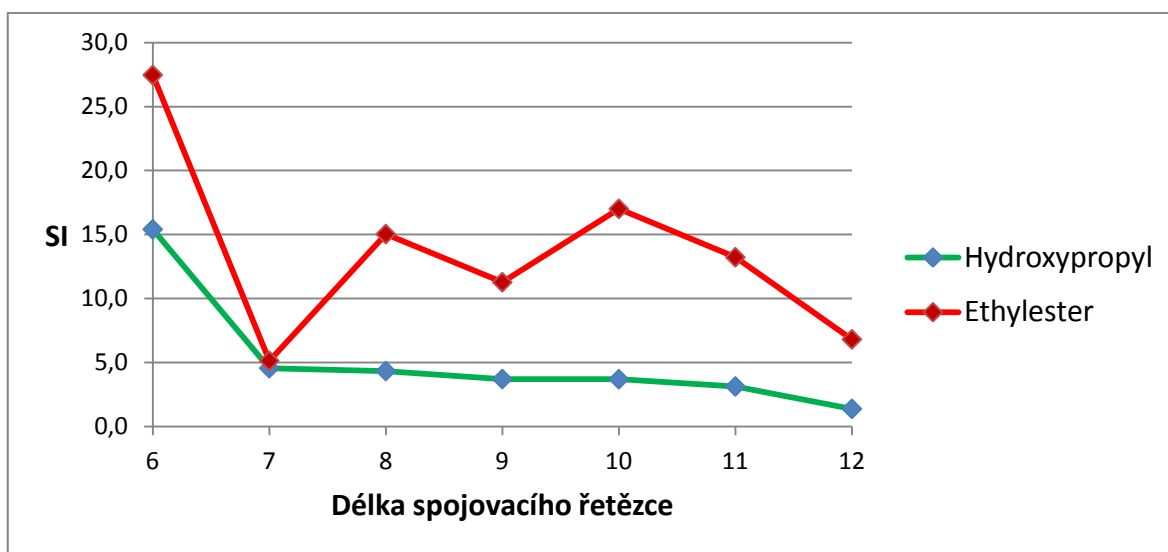
Srovnáním výsledků obou skupin je patrné, že inhibiční potenciál jednotlivých inhibitorů závisí primárně na délce řetězce. Pokud se podíváme na závislost mezi počtem uhlíků ve spojovacím řetězci a hodnotou  $IC_{50}$  (Graf 1), zjistíme, že nejsilnějšími inhibitory vůči AChE jsou sloučeniny s undecylenovým řetězcem. Toto zjištění zhruba koreluje s již dříve publikovanými údaji o podobných typech inhibitorů, kde se délka spojovacího řetězce nejsilnějšího inhibitoru pohybovala rovněž mezi 10 a 12 uhlíky [53] [54].



Graf 1  $IC_{50} = f(n)$

Při srovnání obou strukturálních typů se jako silnější inhibitory jeví sloučeniny se 4-hydroxypropylovým postranním řetězcem; řádově však vykazovaly obě skupiny srovnatelné výsledky.

Pozornost byla věnována také rozdílu v selektivitě nasyntetizovaných látek vůči AChE. Ačkoliv selektivita (podobně jako inhibiční potenciál) není tak výrazná, aby se dalo uvažovat o preklinickém testování, z porovnání SI obou sérií je patrná závislost tohoto ukazatele nejen na délce řetězce spojovacího, ale zejména na struktuře řetězce postranního substituentu (Graf 2).



Graf 2 SI = f(n)

Ze získaných výsledků se tedy dají shrnout základní vztahy mezi strukturou a účinkem:

1. Inhibiční potenciál bispyridiniových, 4-substituovaných sloučenin stoupá úměrně délce spojovacího řetězce až do hodnoty 11 uhlíků; další prodloužení vede k poklesu inhibiční aktivity.
2. Pro selektivitu vůči AChE je klíčový boční substituent v poloze 4 pyridiniových jader. Hydrofilní sloučeniny vykazují inhibici duální, zatímco lipofilnější molekuly inhibují spíše AChE než BChE.

## 8 Závěr

Celkem bylo úspěšně nasyntetizováno 14 symetrických, bispyridiniových inhibitorů acetylcholinesterasy, sedm derivátů 4-(3-hydroxypropyl)pyridinu a sedm látek odvozených od ethyl-isonikotinátu. Jejich inhibiční potenciál vůči cholinesterasám byl stanoven *in vitro* Ellmanovou metodou.

Všechny molekuly vykázaly inhibiční potenciál v řádu mikromolů na litr. Ze zjištěných výsledků se dá shrnout, že nejlepších výsledků dosáhla sloučenina undec-1,11-diylbis(4-ethoxykarbonylpyridinium)-dibromid (**13**), která jednak vykazovala vysoký inhibiční potenciál (druhý nejvyšší ze všech zkoumaných molekul), a zároveň byla relativně selektivní pro AChE (SI = 13,2).

## 9 Použité zdroje

1. STEDMAN, Edgar, STEDMAN, Ellen a EASSON, Leslie H. Choline-esterase. An enzyme present in the blood-serum of the horse. *Biochemical Journal*. 1932, **26**(6), 2056–2066. ISSN 1470-8728.
2. KOELLE, George B. Pharmacology of organophosphates. *Journal of Applied Toxicology*. 1994, **14**(2), 105–109. ISSN 1099-1263.
3. BAJGAR, Jiří et al. Chemical Aspects of Pharmacological Prophylaxis Against Nerve Agent Poisoning. *Current Medicinal Chemistry*. 2009, **16**(23), 2977–2986. ISSN 0929-8673.
4. WHITEHOUSE, Peter J. et al. Nicotinic acetylcholine binding sites in Alzheimer's disease. *Brain Research*. 1986, **371**(1), 146–151. ISSN 0006-8993.
5. PURVES, Robert D. Function of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors. *Nature*. 1976, (261), 149–151. ISSN 1476-4687.
6. ITIER, Valérie a BERTRAND, Daniel. Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Letters*. 2001, **504**(3), 118–125. ISSN 0014-5793.
7. ISHII, Masaru a KURACHI, Yoshihisa. Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Current Pharmaceutical Design*. 2006, **12**(28), 3573–3581. ISSN 1381-6128.
8. SCHOOL OF MEDICINE, UNIVERSITY OF WASHINGTON. CVANS: The Structure Function: *Acetylcholine as a Neurotransmitter*. [Online] [cit. 22. 11. 2011]  
Dostupné z: <http://courses.washington.edu/chat543/cvans/sfp/acetylch.html>
9. PATOČKA, Jiří, KUČA, Kamil a JUN, Daniel. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Králové)*. 2004, **47**(4), 215–228. ISSN 1211-4286.
10. LEUZINGER, Walo et al. Acetylcholinesterase, I. Large-Scale Purification, Homogeneity, and Amino Acid Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1967, **57**(2), 446–451. ISSN 0027-8424.
11. SUSSMAN, Joel L. et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. 1991, **253**(5022), 872–879. ISSN 1095-9203.

12. GETMAN, Damon K. et al. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *American Journal of Human Genetics*. 1992, **51**(1), 170–177. ISSN 0002-9297.
13. MASSOULIÉ, Jean et al. Old and new questions about cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*. 2008, **175**(1–3), 30–44. ISSN 0009-2797.
14. AUDITORE, Joseph V. a HARTMANN, Robert C. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: II. Erythrocyte acetylcholinesterase defect. *American Journal of Medicine*. 1959, **27**(3), 401–410. ISSN 0002-9343.
15. CHOW, F.L., TELEN, M.J. a ROSSE, W.F. The acetylcholinesterase defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Evidence that the enzyme is absent from the cell membrane. *Blood*. 1985, **66**(4), 940–945. ISSN 1528-0020.
16. METZ, J. et al. The Acetylcholinesterase Activity of the Erythrocytes in Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria in Relation to the Severity of the Disease. *British Journal of Haematology*. 1960, **6**(4), 372–380. ISSN 1365-2141.
17. DORI, Amir et al. Readthrough acetylcholinesterase in inflammation-associated neuropathies. *Life Sciences*. 2007, **80**(24–25), 2369–2374. ISSN 0024-3205.
18. MANOHARAN, Indumathi et al. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clinica Chimica Acta*. 2007, **378**(1–2), 128–135. ISSN 0009-8981.
19. BROOMFIELD, C. A. et al. Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1991, **259**(2), 633–638. ISSN 1521-0103.
20. SAXENA, Ashima et al. Bioscavenger for protection from toxicity of organosphorus compounds. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2006, **30**(1–2), 145–147. ISSN 1559-1166.
21. YUE-JIN, Huang et al. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, **104**(34), 13603–13608. ISSN 0027-8424.

22. FIDDER, A. et al. Retrospective Detection of Exposure to Organophosphorus Anti-Cholinesterases: Mass Spectrometric Analysis of Phosphylated Human Butyrylcholinesterase. *Chemical Research in Toxicology*. 2002, **15**(4), 582–590. ISSN 1520-5010.
23. DWORACEK, B. a RUPRECHT, J. Physostigmine: short history and its impact on anaesthesiology of present days. *International Congress Series*. 2002, **1242**, 87–93. ISSN 0531-5131.
24. DOLEŽAL, Martin et al. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1633-9. Kapitola 3: Cholinomimetika, 52–68.
25. LOCKRIDGE, Oksana a QUINN, Daniel M. Esterases. *Comprehensive Toxicology*, 2. edice. Elsevier, 2010. **4**. ISBN 978-0-08-046884-6. Kapitola 4.14: Esterases, 243–273.
26. PASCUZZI, Robert M. The Edrophonium Test. *Seminars in Neurology*. 2003, **23**(1), 83–88. ISSN 0271-8235.
27. COREA, Namali. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, 2007. ISBN: 978-0-08-055232-3. Kapitola Edrophonium, 1–4.
28. KOPMAN, A.F. a EIKERMANN, M. Antagonism of non-depolarising neuromuscular block: current practice. *Anaesthesia*. 2009, **64**(1), 22–30. ISSN 1365-2044.
29. RICHMAN, David P. a AGIUS, Mark A. Treatment of autoimmune myasthenia gravis. *Neurology*. 2003, **61**(12), 1652–61. ISSN 1526-632X.
30. GALES, Barry J. a GALES, Mark A. Pyridostigmine in the Treatment of Orthostatic Intolerance. *Annals of Pharmacotherapy*. 2007, **41**(2), 314–318. ISSN 1542-6270.
31. KEELER, Jill R. et al. Pyridostigmine Used as a Nerve Agent Pretreatment Under Wartime Conditions. *Journal of the American Medical Association*. 1991, **266**(5), 693–695. ISSN 1538-3598.
32. GOLOMB, Beatrice A. Acetylcholinesterase Inhibitors and Gulf War Illnesses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, **105**(11), 4295–4300. ISSN 0027-8424.
33. PATOČKA, Jiří et al. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada, 2004. ISBN: 80-247-0608-3. Kapitola 3: Nervově paralytické látky, 30–44.

34. NOBLIS. Short History of the Development of Nerve Gases. [Online] [cit. 3. 12. 2011]  
Dostupné z: <http://www.noblis.org/MissionAreas/nsi/BackgroundonChemicalWarfare/HistoryofChemicalWarfare/Pages/HistoryNerveGas.aspx>.
35. KINSLEY, Susan. Whatever Happened to the Iraqi Kurds? *Human Rights Watch*. 10.3. 1991. [Online] [cit. 8. 12. 2011]  
Dostupné z: <http://www.unhcr.org/refworld/docid/47fdfb1b0.html>.
36. Matsumoto gassings remebered. *The Japan Times*. 28.6. 2009. [Online] [cit. 8. 12. 2011]  
Dostupné z: <http://www.japantimes.co.jp/text/nn20090628a8.html>.
37. TU, Anthony T. a GAFFIELD, William. *Natural and Selected Synthetic Toxins: Biological Implications*. Colorado: American Chemical Society, 1999. ISBN 978-08-412-1750-8.  
Kapitola 20: Overview of Sarin Terrorist Attacks in Japan, 304–317.
38. KAY, David. Bomb said to hold deadly sarin gas explodes in Iraq. *Conflict in Iraq*. MSNBC, 17. 5. 2004. [Online] [cit. 9. 12. 2011]  
Dostupné z: [http://www.msnbc.msn.com/id/4997808/ns/world\\_news-mideast\\_n\\_africa/t/bomb-said-holddeadly-sarin-gas-explodes-iraq/#.T4X4X6vVxwQ](http://www.msnbc.msn.com/id/4997808/ns/world_news-mideast_n_africa/t/bomb-said-holddeadly-sarin-gas-explodes-iraq/#.T4X4X6vVxwQ)
39. PROKEŠ, Jaroslav. *Úvod do toxikologie*. [Online] Praha: 1.LF UK, 2005. [cit. 17. 12. 2011] Kapitola 1.0: Obecná toxikologie, 9.  
Dostupné z: [https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fsoudni.lf1.cuni.cz%2FData%2Ffiles%2Fskepta2005.doc&ei=q\\_iFT8KQEMXYsgakk8jqBg&usg=AFQjCNH7xKMJnQ0ReWq4RwKp9DLQ7GGvRw&sig2=0bHZxITC7S0HvT\\_F43TDDA&cad=rja](https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fsoudni.lf1.cuni.cz%2FData%2Ffiles%2Fskepta2005.doc&ei=q_iFT8KQEMXYsgakk8jqBg&usg=AFQjCNH7xKMJnQ0ReWq4RwKp9DLQ7GGvRw&sig2=0bHZxITC7S0HvT_F43TDDA&cad=rja)
40. KUČA, Kamil et al. Effective bisquaternary reactivators of tabun-inhibited AChE. *Journal of Applied Toxicology*. 2005, **25**(6), 491–495. ISSN 1099-1263.
41. PETROIANU, George A. et al. New K-Oximes (K-27 and K-48) in comparison with Obidoxime (LuH-6), HI-6, Trimedoxime (TMB-4), and Pralidoxime (2-PAM): Survival in Rats Exposed IP to the Organophosphate Paraoxon. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2007, **17**(7), 401–408. ISSN 1537-6524.
42. THIERMANN, Horst, SEIDL, Stephan a EYER, Peter. HI 6 dimethanesulfonate has better dissolution properties than HI 6 dichloride for application in dry/wet autoinjectors. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996, **137**(2), 167–176. ISSN 0378-5173.



43. DOCTOR, Bhupendra P. et al. Cholinesterases as scavengers for organophosphorus compounds: Protection of primate performance against soman toxicity. *Chemico-Biological Interactions*. 1993, **87**(1–3), 285–293. 0009-2797.
44. MOR, Tsafir S. et al. Expression of recombinant human acetylcholinesterase in transgenic tomato plants. *Biotechnology and Bioengineering*. 2001, **75**(3), 259–266. ISSN 1097-0290.
45. HARRIS, L. a STITCHER, D. Protection against diisopropylfluorophosphate intoxication by pyridostigmine and physostigmine in combination with atropine and mecamlamine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1984, **327**(1), 64–69. ISSN 1432-1912.
46. PATOČKA, Jiří a KASSA, Jiří. Huperzine A: A Prospective Prophylactic Antidote Against Organophosphate Nerve Agents. *ASA Newsletter*. 1999, (71), 16–19. ISSN 1057-9419.
47. PUU, G. Ketamine protects acetylcholinesterase. *Biochemical Pharmacology*. 1988, **37**(5), 969–970. ISSN 0006-2952.
48. PATOČKA, Jiří et al. Prophylaxis Against Nerve Agent Intoxications. *Defence Science Journal*. 2006, **56**(5), 775–784. ISSN 0011-748X.
49. KASSA, Jiří et al. A Combination of Pyridostigmine with Anticholinergic Drugs: Effective Pharmacological Pretreatment of Soman-Poisoned Mice. *ASA Newsletter*. 2001, (84), 16–19. ISSN 1057-9419.
50. POHANKA, Miroslav, HRABINOVÁ, Martina a KUČA, Kamil. Diagnosis of Intoxication by the Organophosphate VX: Comparison Between an Electrochemical Sensor and Ellman's Photometric Method. *Sensors*. 2008, **8**(9), 5229–5237. ISSN 1424-8220.
51. ŽĎÁROVÁ-KARASOVÁ, Jana et al. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chemické Listy*. 2010, **104**(1), 46–50. ISSN 1213-7103.
52. MUSÍLEK, Kamil et al. Preparation and in Vitro Screening of Symmetrical Bis-Isoquinolinium Cholinesterase Inhibitors Bearing Various Connecting Linkage - Implications for Early Myasthenia Gravis Treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011, **46**(2), 811–818. ISSN 0223-5234.

53. MUSÍLEK, Kamil et al. Preparation, in vitro screening and molecular modelling of symmetrical 4-tert-butylpyridinium cholinesterase inhibitors - Analogues of SAD-128. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011, **21**(1), 150–154. ISSN 0960-894X.

54. ŠEPSOVÁ, Vendula. *Testování inhibičního potenciálu reaktivátorů AChE in vitro*. Hradec Králové, 2010. Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany. Vedoucí diplomové práce PharmDr. Jana Žďárová-Karasová, PhD.

55. PASADENA CITY COLLEGE. Přejato: [Online] [cit. 26. 2. 2012.]  
Dostupné z: [http://faculty.pasadena.edu/dkwon/chap%208\\_files/images/image61.png](http://faculty.pasadena.edu/dkwon/chap%208_files/images/image61.png).

56. CHEMWIKI. Přejato a upraveno: [Online] [cit. 25. 2. 2012.]  
Dostupné z: <http://chemwiki.ucdavis.edu/@api/deki/files/11455/=image102.png>.

57. SCIELO. Přejato a upraveno: [Online] [cit. 27. 2. 2012.]  
Dostupné z: <http://www.scielo.br/img/revistas/jbchs/v22n10/a23sh01m.jpg>.