

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**DERIVÁTY PYRAZINU JAKO POTENCIÁLNÍ INHIBITORY
ACETYLCHOLINESTERASY IN VITRO**

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Hradec Králové 2006

Jiří Binder

Děkuji paní RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. a panu Ing. Kamilu Kučovi, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc a podnětné připomínky při vypracování mé diplomové práce.

Dále bych rád poděkoval Martině Hrabinové, Martinu Paarovi, Martě Chlupáčové a Mgr. Kamilu Musílkovi za pomoc se syntetickou částí.

Obsah

Seznam zkratk:	4
1. Úvod a cíl práce	5
2. Teoretická část	6
2.1 Cholinesterasy	6
2.1.1 Butyrylcholinesterasa.....	6
2.1.2 Acetylcholinesterasa.....	7
2.2 Inhibitory acetylcholinesterasy	12
2.2.1 Reaktivní inhibitory	12
2.2.2 Nereaktivní inhibitory.....	17
3. Metodická část	19
3.1 Chemikálie	19
3.2 Teploty tání	19
3.3 Tenkovrstvá chromatografie.....	19
3.4 Krystalizace.....	19
3.5 Nukleární magnetická rezonance	19
3.6 Elementární analýza	20
4. Experimentální část	21
4.1 Syntézy.....	21
4.1.1. Kvarternizace pyridinu a jeho derivátů.....	25
4.1.2. Kvarternizace pyrazinu a jeho derivátů	33
4.2 Biochemická část	39
4.2.1 Princip stanovení afinity inhibitorů k AChE	39
4.2.2 Experimentální stanovení afinity inhibitorů k AChE	40
5. Výsledky a diskuse	42
6. Literatura	48

Seznam zkratk:

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
BuChE	butyrylcholinesterasa
ChAT	cholinacetyltransferasa
ChE	cholinesterasa
K_{DIS}	disociační konstanta
NMR	nukleární magnetická rezonance
NPL	nervově paralytická látka
OFI	organofosforové inhibitory
t.t.	teplota tání
TLC	tenkovrstvá chromatografie

1. Úvod a cíl práce

Inhibitory AChE jsou v současnosti užívány jako pesticidy (parathion, malathion), jako léčiva Alzheimerovy choroby (donepezil, rivastigmin, galantamin), k léčbě myastenia gravis (neostigmin, pyridostigmin), k premedikaci před otravou nervově paralytickými látkami (SAD-128) či v oftalmologii (fysostigmin). Syntéza těchto látek je stále aktuální na mnoha světových pracovištích. Cílem mé práce bylo jednoduchou obměnou struktury pyrazinu, acetylpyrazinu a diazachalkonu připravit nové účinné inhibitory AChE. Pro porovnání jsem připravil analogické struktury odvozené od pyridinu. Dalším cílem mé práce bylo otestovat inhibiční schopnost nově syntetizovaných inhibitorů AChE užitím standardní *in vitro* metody.

2. Teoretická část

2.1 Cholinesterasy

Historie objevu cholinesteras začíná na počátku 20. století, kdy pozdější nositel Nobelovy ceny H. Hallet v r. 1914 objevil, že krev je schopna hydrolyzovat cholinové estery. Ve 30. letech 20. století E. Stedman provedl částečnou purifikaci tohoto enzymu z koňské plazmy a nazval jej cholinesterasa. Později, zejména po druhé světové válce, byla prokázána existence celé řady cholinesteras a dalších esteras; objevily se práce o jejich katalytických vlastnostech, aktivních místech, inhibičním účinku některých látek a o klinickém významu aktivity cholinesteras v krvi, v dalších tělních tekutinách a orgánech. V posledních letech se výzkum této skupiny enzymů dostává z oblasti teoretického zkoumání do stádia praktické aplikace. Byly objeveny jiné diagnostické a terapeutické významy než ovlivnění aktivity esteras po účinku inhibitorů. Ukazuje se větší komplexnost účinku těchto enzymů a otevírají se nové možnosti zkoumání vlastností a významu jejich molekulárních forem. Cholinesterasa (ChE) je obecný termín používaný pro rodinu přírodních enzymů, které patří do esterasové rodiny ve vyšších eukaryotech. V lidském těle existují 2 typy ChE s různými variacemi a jmény. Jeden typ ChE je acetylcholinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7). Enzym se nachází v erythrocytech, nervových zakončeních, v plicích, slezině a všech částech mozku. Je vázán membránovým glykoproteinem a existuje v několika molekulárních formách. Druhý typ ChE je butyrylcholinesterasa (BuChE, EC 3.1.1.8). Existuje v plazmě a má více než 11 izoenzymatických variant. BuChE se také nachází v játrech, hladké svalovině, střevech, pankreatu, srdci a bílé hmotě mozku¹.

2.1.1 Butyrylcholinesterasa

BuChE je hydrolytický enzym patřící do rodiny karboxylesteras typu B. Je to homotetramer tvořený dvěma dimery, podjednotky jsou spojeny disulfidickými můstky a nekovalentními hydrofobními interakcemi. Každá podjednotka obsahuje 574 aminokyselin a devět sacharidových řetězců. Relativní molekulová hmotnost enzymu je 348 000. Aktivní centrum, které se nachází na každé ze čtyř

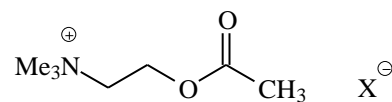
identických podjednotek, obsahuje aminokyselinu serin². Synonyma pro butyrylcholinesterasu jsou např. pseudocholinesterasa, nespecifická cholinesterasa či pouze jen cholinesterasa.

BuChE je sekreční enzym produkovaný jaterními buňkami do krve. V plazmě katalyzuje hydrolytické štěpení esterů cholinu a některých dalších substrátů. Přírodní specifický substrát tohoto enzymu však není znám, stejně tak jeho funkce v krvi. Má širší substrátovou specifitu než jemu příbuzná AChE - enzym podílející se na odbourávání acetylcholinu v nervových synapsích, který se v plazmě nevyskytuje. BuChE se liší od AChE ve specifitě k některým substrátům. Štěpí například benzoylcholin, ale nehydrolyzuje acetyl-beta-methylcholin; u acetylcholinesterasy je to naopak. BuChE je obsažena ve většině buněk, kromě erytrocytů.

Existuje několik genetických variant BuChE. Některé z nich vykazují nižší aktivitu, což se může patologicky projevit až po podání určitých léků³. Syntéza BuChE a s tím i její aktivita v plazmě klesá v případě poškození jaterního parenchymu nebo při nedostatku proteinů v dietě. Nevratně je enzym inhibován organofosforovými inhibitory (OFI) používanými jako pesticidy v zemědělství. Jelikož je při otravě OFI inhibována i AChE na synapsích, vypovídá snížená aktivita BuChE také o míře inhibice tohoto druhého enzymu, který je nezbytný při přenosu nervového vzruchu.

2.1.2 Acetylcholinesterasa

AChE je enzym, patřící do skupiny serinových esterás, který štěpí neurotransmitter acetylcholin uvolňovaný z nervových zakončení do synapsí při přenosu nervového vzruchu.

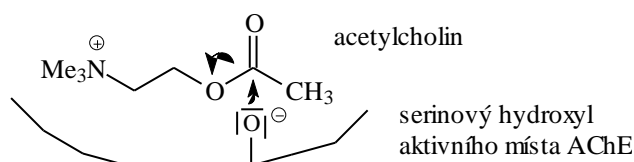


Acetylcholin

AChE je součástí neuronální membrány a spolu s cholinergním receptorem tvoří systém ovládající její propustnost pro malé ionty. Je složena ze čtyř proteinových subjednotek, z nichž dvě a dvě jsou stejné a označují se α a β . V roztoku tvoří AChE kompaktní supramolekulární systém s globulární strukturou⁴.

Aktivní místo enzymu je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu. V jeho blízkosti se nacházejí ještě aminokyseliny histidin a glutamová kyselina. Aktivní místo je umístěno v hluboké a úzké prohlubni, na jejímž povrchu se nachází větší množství aromatických zbytků. Podle nejnovější teorie právě tento elektronově bohatý systém prostřednictvím kation- π interakce zajišťuje vazbu kvarterního dusíkového atomu substrátu k aktivnímu místu enzymu⁵. Původní teorie předpokládala vazbu kvarterního dusíkového atomu substrátu k tzv. anionickému místu, tvořeného karboxylovou funkcí glutamové kyseliny⁶. K hydrolýze acetylcholinu účinkem AChE dochází tak, že se molekula substrátu přiblíží k aktivnímu centru enzymu. Molekula acetylcholinu je orientována acetylovou skupinou k hydroxylové skupině serinu (schéma 1). Při hydrolýze dochází k přenosu acetylu na hydroxylovou skupinu serinu. Důsledkem acetylace enzymu je řada konformačních změn v molekule AChE. Acetylovaný enzym je nestálý a v přítomnosti vody rychle deacetyluje, čímž se obnovuje jeho nukleofilní hydroxylová skupina serinu⁷.

Schéma 1: Orientace acetylcholinu v aktivním místě AChE



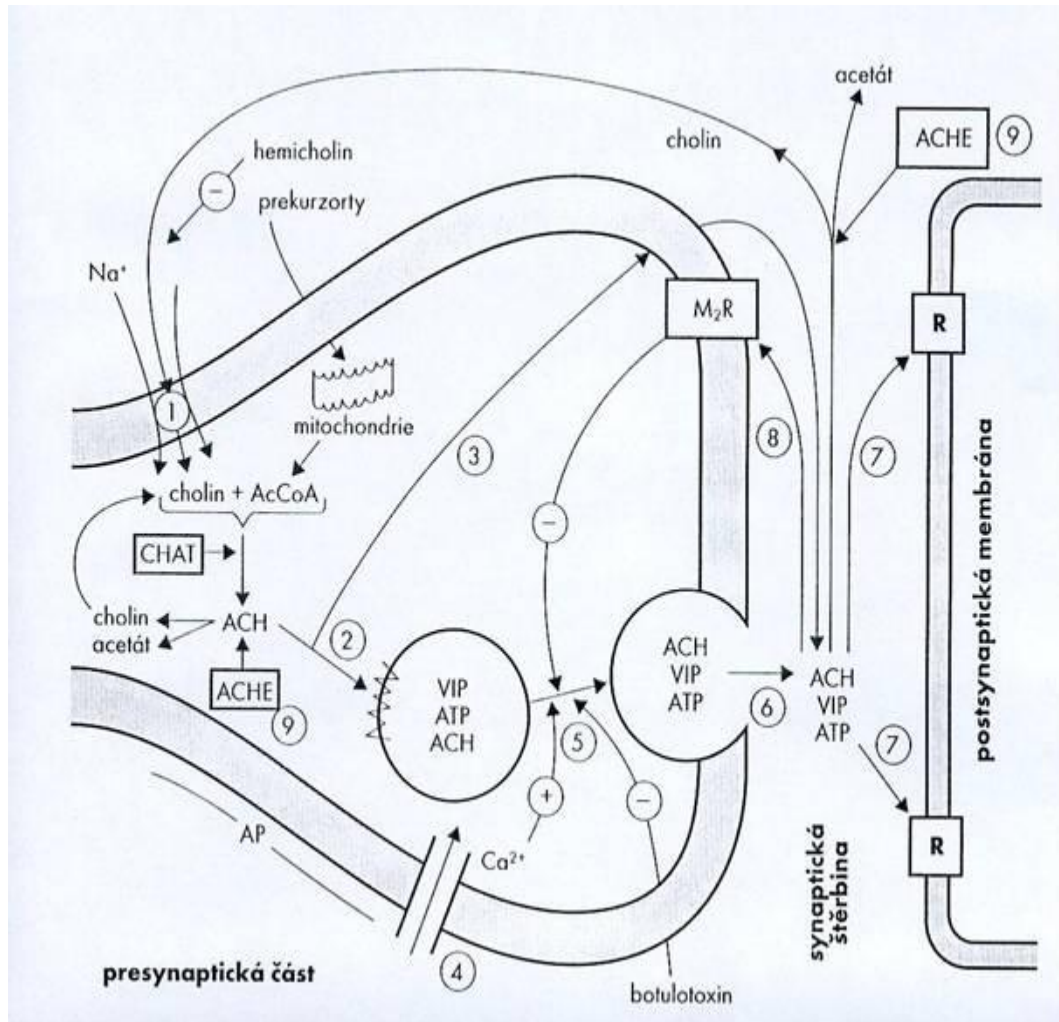
Rychlost hydrolýzy je vysoká. Jedna molekula enzymu hydrolyzuje řádově 10^5 – 10^6 molekul acetylcholinu za minutu. Kinetika hydrolýzy jeví odchylky od kinetiky Michaelise a Mentenové ve smyslu inhibice nadbytkem substrátu.

Závislost rychlosti enzymové hydrolýzy acetylcholinu na jeho koncentraci vykazuje maximum v rozmezí $2.5 - 3.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, i když toto substrátové optimum poněkud závisí na pH, obsahu solí v reakčním médiu a na zdroji použitého enzymu⁸.

AChE obsahuje kromě aktivního místa i jiná vazebná místa, tzv. allosterická, kam se mohou vázat i další ligandy. Ty nemusí mít strukturu podobnou nativnímu substrátu a k vyvolání výrazné změny enzymové aktivity stačí i velmi malé koncentrace těchto látek. Přítomnost těchto allosterických míst byla v případě AChE prokázána kinetickými studiemi i pomocí monoklonálních protilátek⁹.

Pochody cholinergní transmise

Schéma 2: Pochody cholinergní transmise



ACh je v cytoplasmě nervového zakončení syntetizován z cholinu + acetyl-CoA (AcCoA) enzymem cholinacetyltransferasou (ChAT). Cholin je aktivně přijímán do nervového zakončení (1) – hemicholin vstup blokuje. Acetyl-CoA vzniká v mitochondriích. Vzniklý ACh je transportován specifickými transportními proteiny do vezikul (2) kde je skladován spolu s kotransmitery, pouze malá část cytoplazmatického ACh zůstává volně v cytoplasmě a může z nervového zakončení difundovat (3) – „nekvantální“ uvolňování ACh. Když akční potenciál (AP) dosáhne nervového zakončení, dochází ke vstupu Ca²⁺ do nervového zakončení napěťově řízenými kalciovými kanály (4). Ca²⁺ umožní splnutí

membrány vezikul s membránou nervového zakončení (5) a vylití obsahu určitého počtu – kvanta vezikul do synaptické štěrbině – „kvantální“ výlev (6) (tento proces blokuje např. botulotoxin). ACh v synaptické štěrbině působí na postsynaptické receptory (7), kde vyvolává parasymptomimetické účinky, a na presynaptické „autoreceptory“ (8) – jejich ovlivněním moduluje množství uvolňovaného ACh akčním potenciálem. Na receptory je molekula ACh navázána velmi krátce (cca 2 ms) – po uvolnění je ACh okamžitě hydrolyzován acetylcholinesterasou (AChE – hydrolyzuje i volný cytoplazmatický ACh) na cholin + kyselinu octovou (9)¹⁰.

2.2 Inhibitory acetylcholinesterasy

Inhibice enzymu

AChE může být inhibována celou řadou látek. Je-li jejich inhibiční účinek založen na nevazebných interakcích, jedná se o reverzibilní proces (např. v případě kvarterních amoniových solí včetně reaktivátorů). Některé typy sloučenin však reagují s hydroxylovou skupinou serinu za vzniku kovalentní vazby. Je-li vzniklý komplex stabilní, jedná se v podstatě o ireverzibilní inhibici. Inhibicí AChE se zvyšuje koncentrace ACh na všech místech, kde ACh působí jako mediátor (tj. periferních efektech /M receptory/, ve vegetativních gangliích /N_N receptory/ a nervo-svalovém spojení /N_M receptory/). Proto se inhibitory AChE řadí mezi nepřímo působící parasymptomimetika (cholinomimetika). Princip působení všech inhibitorů AChE je podobný. Rozdíly mezi působením jednotlivých inhibitorů závisí na charakteru reakce s AChE (závislost na chemické struktuře látky), tj. rychlosti uvolňování (deacylace) enzymu.

Inhibitory můžeme dělit z různých pohledů např. reverzibilní/ireverzibilní, reaktivní/nereaktivní nebo podle chemické struktury.

Inhibitory AChE	Reaktivní	Acylující inhibitory Karbamáty Organofosfáty a organofosfonáty
	Nereaktivní	Nekvarterní látky Kvarterní látky

2.2.1 Reaktivní inhibitory

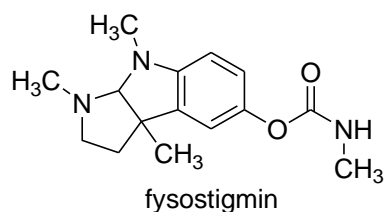
Acylující inhibitory

Acylující inhibitory reagují s AChE podobně jako ACh. Blokáda enzymu je krátkodobá a plně reverzibilní. Tyto látky obsahují ve své struktuře skupinu kyseliny octové. Zbytek této kyseliny se naváže na serinový hydroxyl

esteratického centra. Tak vznikne acetylovaná AChE, která je reaktivována hydrolytickým odštěpením kyseliny octové.

Karbamáty

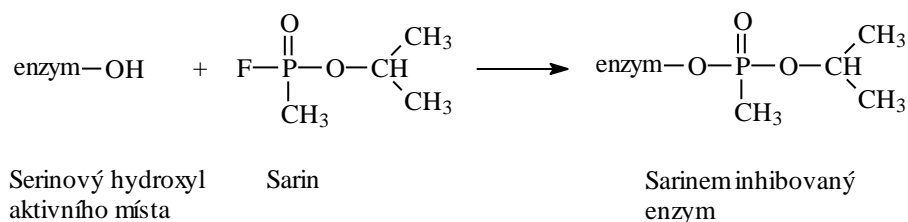
Jedná se o reverzibilní inhibitory. Ve své molekule obsahují skupinu karbamové kyseliny. Primární kontakt nastává vždy mezi kationickým dusíkem a tak zvaným anionickým centrem enzymu. V průběhu hydrolytické reakce se kyselá skupina esteru kovalentně váže na esterasu. Esterasa se při hydrolýze ACh acetyluje. Stejným mechanismem při hydrolýze karbamátů přijímá karbamoylovou skupinu. Teprve po ztrátě navázané kyselé skupiny je esterasa opět schopna další funkce. Potřebný interval je po navázání karbamové skupiny podstatně delší (minuty až hodiny) než po acetylaci (milisekundy). Karbamátové inhibitory s terciárním dusíkem se dobře vstřebávají, pronikají hemato-encefalitickou bariérou a mají periferní i centrální účinky. Sloučeniny typu kvarterních bází působí především periferně. Navíc mají přímé účinky na nikotinové receptory, především na nervosvalovou ploténku a jsou proto výhodné pro léčbu myastenia gravis. Mezi zástupce se řadí fysostigmin, neostigmin, pyridostigmin či distigmin. Fysostigmin je alkaloid ze semen kalabarového bobu. Silně inhibuje srdeční funkce a stimuluje střeva, proto nemá centrální využití. Syntetický analog fysostigminu neostigmin má využití v léčbě myastenia gravis stejně jako pyridostigmin, který má pomalejší nástup účinku, ale trvá déle. Myastenia gravis je choroba způsobená poruchou neuromuskulárního přenosu na nervosvalové ploténce. Je charakterizována insuficiencí nervosvalového procesu. Jde o autoimunní onemocnění, kdy u většiny postižených je zvýšená hladina protilátek proti acetylcholinovému receptoru. Rozvoj onemocnění až do myasthenické krize ohrožuje pacienta respirační nedostatečností a řadou následných život ohrožujících komplikací. Odstraněním protilátek z krve nemocných použitím plazmaferézy se na nějaký čas pacientův stav zlepší. Někdy chorobu zlepší také chirurgické odstranění thymu. Stav zlepší i snížení hydrolýzy uvolněného AChE. Současnou aplikací parasymptolytika se dají oslabit rušivé parasymptomimetické projevy¹¹.



Organofosfáty a organofosfonáty

Jedná se o vysoce toxické látky, které se používají jako nervově paralytické látky (sarin, soman aj.) nebo insekticida (parathion, malathion aj.). Tyto typy inhibitorů se vážou k enzymu kovalentní chemickou vazbou (Schéma 3). Organofosforové sloučeniny ze skupiny alkylfosfátů, alkylfosfonátů, pyrofosfátů a většiny jejich thioanalog patří mezi nejvýznamnější představitele ireverzibilních inhibitorů acetylcholinesterasy.

Schéma 3: Vazba organofosfátů na AChE

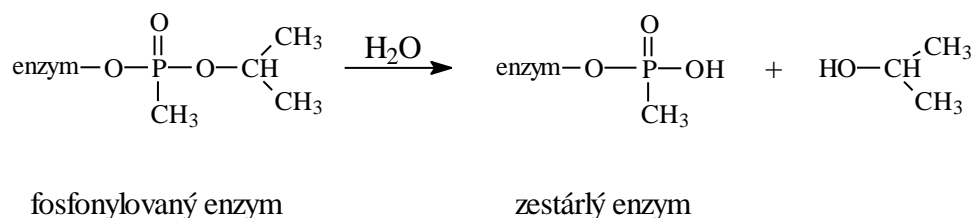


Širší paleta organofosforových sloučenin byla připravena ve 20. století. Jejich struktura a toxické vlastnosti musely být známy někdy kolem roku 1930, protože v Anglii a v Německu probíhalo intenzivní studium těchto látek v souvislosti s jejich možným válečným využitím. Tak byl např. v Anglii připraven diisopropylfluorofosfát (DFP) a v Německu bis(dimethylamido)-fluorofosfát (dimefox)¹². Mezi nejtoxičtější pak patří sarin, soman a látka VX¹³.

Organofosforové sloučeniny reagují s hydroxylovou skupinou serinu v aktivním místě enzymu za vzniku esterové vazby. Vazba mezi enzymem a OFI je odolná vůči působení vody, aktivní místo je potom trvale a téměř ireverzibilně

zablokováno a enzym nemůže plnit svoji fyziologickou úlohu. K uvolnění serinového hydroxylylu v aktivním místě je nutné použít činidel, která jsou silnějšími nukleofily než voda. Tyto sloučeniny je nutné aplikovat co nejdříve, aby nedošlo ke stárnutí enzymu. Jako stárnutí inhibovaného enzymu označujeme přeměnu reaktivovatelné formy enzymu na nereaktivovatelnou. Je to proces, při kterém fosforylovaný nebo fosfonylovaný enzym ztrácí schopnost být reaktivován účinkem nukleofilních činidel¹⁴. Podstatou stárnutí je postupná hydrolýza OFI za vzniku odpovídajícího alkoholu a komplexu enzym-volná kyselina fosforečná nebo fosfonová (Schéma 4). Determinujícím faktorem rychlosti stárnutí fosforylovaného nebo fosfonylovaného enzymu je samotná povaha odštěpovaného alkylu – rychleji probíhá dealkylace u větvených alkylů (např. u somanu). Poločasy stárnutí se za fyziologických teplot pohybují v rozmezí od několika minut až po desítky hodin (např. komplex AChE-soman pro AChE lidského svalu je $t_{1/2} = 2,6$ min. a pro AChE svalů potkana je $t_{1/2} \sim 30$ minut)¹⁵.

Schéma 4: Stárnutí inhibovaného enzymu



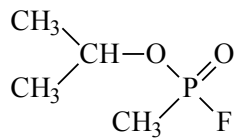
V intoxikovaném organismu se neodbouraný ACh hromadí na všech místech, kde za fyziologických podmínek probíhá jeho syntéza a uvolňování z intracelulárních depot. Trvalé dráždění receptorů se pak projeví rozvojem toxických příznaků jako je mióza, zvýšená sekrece žláz s vnější sekrecí, bronchospasmus, křeče a ochrnutí dýchacího svalstva. Těmto klinickým příznakům intoxikace NPL v důsledku nadměrného dráždění cholinergních receptorů se také říká akutní cholinergní krize. Ke smrti dochází v důsledku zástavy dýchání a selhání kardiovaskulárního systému.

Terapie otrav

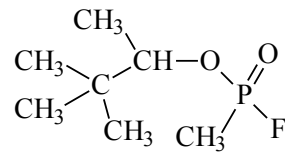
Základem léčby je specifická antidotní terapie časné fáze akutní otravy, k níž se používají dvě skupiny antidot:

a) anticholinergika – blokují účinek nahromaděného acetylcholinu na postgangliových zakončeních parasympatiku, motorických zakončeních příčně pruhovaného svalstva, v gangliích a synapsích centrální nervové soustavy (funkční antidota) – např. atropin, benaktyzin, skopolamin.

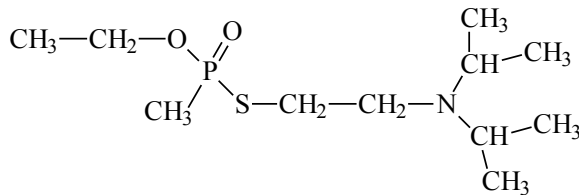
b) reaktivátory acetylcholinestery – defosforylují, resp. defosfonylují inhibovaný enzym, a tím obnovují jeho fyziologickou funkci v organismu (kauzální antidota) – např. pralidoxim, trimedoxim, HI-6¹⁶.



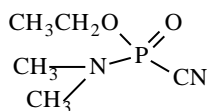
sarin



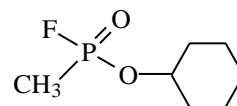
soman



VX



tabun



cyklosarin

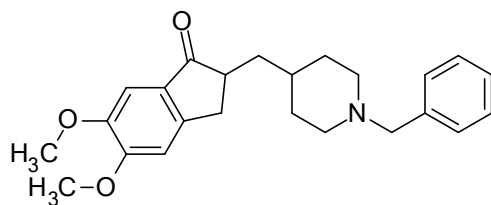
2.2.2 Nereaktivní inhibitory

Jedná se o látky, které inhibují AChE na základě nevazebných interakcí, které nevedou k vytvoření kovalentní vazby mezi inhibitorem a serinovým hydroxylyem v aktivním esteratickém centru enzymu. Inhibici mohou způsobit interakcí s α -anionickým místem nebo s allosterickými místy na β řetězci.

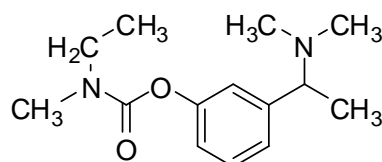
Nekvarterní

Jedná se o látky různých struktur, jejichž význam spočívá zejména v léčbě Alzheimerovy choroby. Alzheimerova choroba (AD), neurodegenerativní porucha stáří, děsí stále více lidí na celém světě. Etiologie choroby zůstává nejasná, je však známo, že se na ní podílejí jak genetické, tak negenetické faktory¹⁷ a poznatky o chorobě pokročily natolik, že její terapie začíná být reálná¹⁸. Choroba je provázána řadou patologických neurochemických změn, spojených jak s ukládáním patologických bílkovin, tak s poruchami nervového přenosu. Nejvýznamnější změny však byly nalezeny v centrálním cholinergním systému¹⁹. V mozku lidí s AD je významným způsobem snížena aktivita cholinacetyltransferasy (ChAT), enzymu syntetizujícího z acetyl-CoA a cholinu acetylcholin²⁰. Deficit mozkového ACh je spojen s poruchami kognitivních funkcí, které představují hlavní symptom AD²¹. Deficit ACh je doprovázen postupnou degenerací cholinergních neuronů v různých částech mozku, zejména však v oblasti Meynertova jádra (nucleus basalis Meynerti)²². Současná farmakoterapie AD je proto zaměřena na zlepšení cholinergních funkcí. Možností, jak cholinergní systém ovlivnit, je více, ale klinického uplatnění zatím dosáhlo jen podávání inhibitorů AChE. Směr orientovaný na používání inhibitorů AChE přinesl již první klinické výsledky a dále se pracuje na jeho vylepšení. V roce 1993 bylo ve Spojených státech schváleno použití takrinu. Ten sice zdaleka nesplnil všechna očekávání (je hepatotoxický a lze jej použít jen u některých pacientů), přesto bylo jeho zavedení do klinické praxe přivítáno jak gerontology, tak pacienty, neboť pro část z nich představoval významné zlepšení kvality života²³. Dalšími léčivy ze skupiny inhibitorů AChE jsou donepezil a rivastigmin. Obě léčiva mají lepší terapeutické účinky s menším výskytem nežádoucích reakcí²⁴. Další typy inhibitorů AChE, vhodných pro léčení AD, jsou stále zkoušeny²⁵.

Zajímavou látkou ze skupiny inhibitorů AChE je huperzin A, alkaloid izolovaný z čínského mechu *Huperzia serrata*. Huperzin A proniká přes hematoencefalickou bariéru, je centrálně účinným parasymptomimetikem.



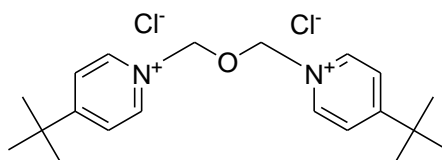
donepezil



rivastigmin

Kvarterní látky

Jedná se o látky, které se jako falešné substráty mohou reverzibilně navázat na aktivní centrum esteras a snížit tak jejich aktivitu. Působí především periferně (edrofonium se používá např. k diagnóze myastenia gravis). Významné využití je v premedikaci při otravě jinými inhibitory AChE a to zejména NPL a pesticidy. Nejznámější látkou je SAD-128 (1,1'-oxybis(methylen)bis(4-*tert*-butylpyridinium)-dichlorid)²⁶. Mechanismus účinku je založen na kompetitivní inhibici AChE, což způsobí, že NPL nemůže vstoupit do kavity enzymu a inhibice je nemožná. Ačkoli kvarterní látky neprostupují ve velké koncentraci skrz hemato-encefalitickou bariéru, existuje mnoho prací, kde se pojednává o jejich využití pro léčbu AD²⁷.



SAD 128

3. Metodická část

3.1 Chemikálie

Chemikálie použité v této práci byly zakoupeny od firmy Aldrich a Merck v kvalitě “čistý”. Výchozí chalkony, jejichž syntéza není popsána v této práci, byly získány od Dr. Veroniky Opletalové (FaF, Univerzita Karlova).

3.2 Teploty tání

Teploty tání byly měřeny na bloku Boetius. Jejich hodnoty nebyly korigovány.

3.3 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na deskách DC-Alufolien Cellulose F. Chromatogramy byly vyvíjeny vzestupným způsobem v chromatografických komorách nasycených parami mobilní fáze, nejdříve dvě hodiny po nalití eluční soustavy. Složení mobilní fáze – butanol : kyselina octová : voda – 5 : 1 : 2. K detekci kvarterních látek bylo použito Dragendorfovo činidlo. TLC sloužilo k monitorování průběhu reakce, ověření čistoty nově syntetizovaných látek a ke stanovení retenčního faktoru (Rf).

3.4 Krystalizace

Odstraňování nečistot z monokvarterního produktu bylo prováděno rekrystalizací z butanolu.

Biskvarterní produkt byl znečištěn zejména monokvarterním meziproduktem.

K jeho odstranění bylo použito odkrystalizování z acetonitrilu.

3.5 Nukleární magnetická rezonance

Spektra ^1H NMR byla měřena na přístroji Varian Gemini 300 (pracovní frekvence 300.08 MHz). Hodnoty chemických posunů jsou uvedeny v jednotkách ppm a jsou vztaženy dimethylsulfoxidu. Hodnoty interakčních konstant J jsou uvedeny v Hz. Spektra byla zpracována programem Mestrec (Mestrelab Research, verze 4.8.6.0).

3.6 Elementární analýza

Elementární analýzy (C, H, N) byly provedeny na přístroji Perkin-Elmer 2400.

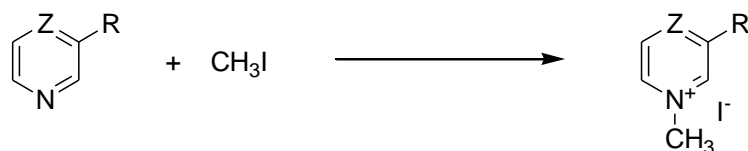
4. Experimentální část

4.1 Syntézy

Při přípravě sloučenin byly použity postupy běžně používané v organické syntéze. V případě známých látek se jednalo o reprodukci již popsaných postupů²⁸, u látek nových bylo postupováno *per analogiam*. Látky byly charakterizovány obvyklým způsobem, tj. teplotou tání, ¹H NMR spektry a elementární analýzou (jen nově syntetizované látky).

Monokvarterní látky byly připraveny reakcí pyridinu a pyrazinu či jejich derivátů s methyljodidem (Schéma 5).

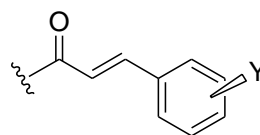
Schéma 5: Příprava monokvarterních látek



Z CH₂, N

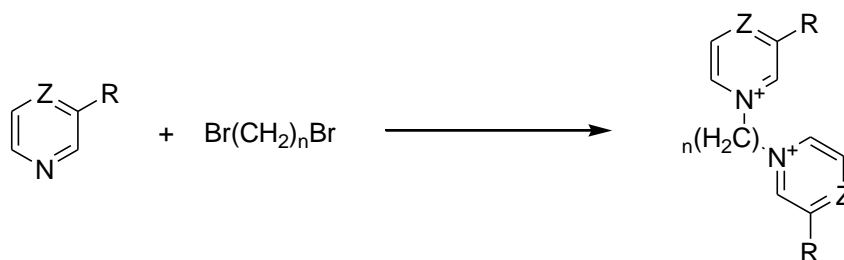
R H, COCH₃,

Y 4-OH ; 3-OCH₃, 4-OH ; 4-N(CH₃)₂



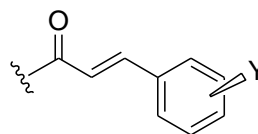
Biskvarterní látky byly připraveny reakcí pyridinu a pyrazinu či jejich derivátů s patřičnými dihalogenalkyly (Schéma 6).

Schéma 6: Příprava biskvarterních látek



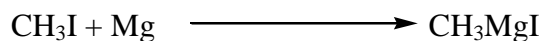
n 1-6
Z CH₂ , N

R H, COCH₃ ,
Y 4-OH ; 3-OCH₃, 4-OH ; 4-N(CH₃)₂



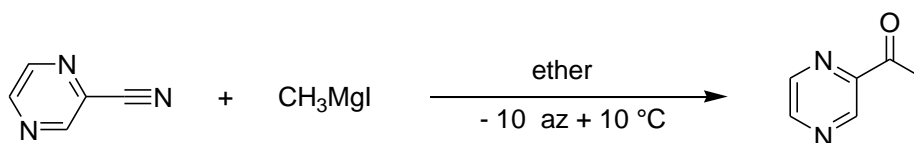
Jednotlivé reakce probíhaly za podmínek uvedených dále. Jejich průběh byl monitorován pomocí TLC každou hodinu. Pro kontrolu čistoty bylo u získaných produktů užito TLC (3.3). Případné nečistoty byly odstraněny rekrystalizací (3.4). Následně byl změřen teplota tání (3.2) a v případě rozptýlu do 3 °C byl produkt odeslán na NMR (3.6) a elementární analýzu (3.7). V případě rozptýlu nad 3 °C byl produkt opět rekrystalizován (3.4).

Methylmagnesiumjodid



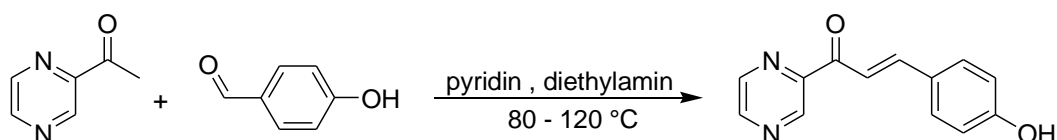
K 7.30 g hořčkových hoblin (0.3 mol) v 200 ml etheru bylo přikapáno 42.6 g methyljodidu (0.3 mol). Methylmagnesiumjodid byl použit při syntéze acetylpyrazinu.

Acetylpyrazin



K 49.90 g (0.3 mol) methylmagnesiumjodidu ve 200 ml absolutního etheru byl za stálého míchání a při teplotě -10 až $+10$ °C přikapán roztok 13.45 g pyrazin-2-karbonitrilu (0.128 mol) v 50 ml absolutního etheru. Při uvedené teplotě byla směs míchána 1 hodinu, a potom rozložena opatrným vylitím na led, přičemž teplota nepřestoupila 15 °C. Vyloučená sraženina byla částečně rozpuštěna přidáním 50 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné objemově 1:1 a směs byla kontinuálně extrahována etherem. Etherový extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a ether byl oddestilován. Produkt byl přečistěn destilací za sníženého tlaku. Bylo získáno 9.92 g (64 %) oranžových krystalů.

(E)-3-(4-hydroxyfenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on

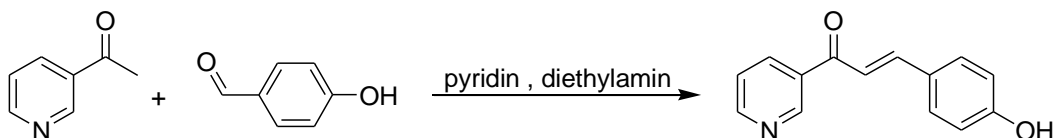


2.44 g (0.02 mol) acetylpyrazinu a 2.44 g (0.02 mol) 4-hydroxybenzaldehydu bylo rozpuštěno v 8.8 ml pyridinu. K reakční směsi bylo přidáno 2.00 ml

(0.02 mol) diethylaminu a směs byla zahřívána 2 hodiny v glycerinové lázni při teplotě 80 – 120 °C. Po zchladnutí byla směs nalita do 400 ml ledové vody okyselené kyselinou octovou na pH 3 a následně přes noc ponechána v lednici. Vyloučená sraženina byla odsáta. Směs byla překrystalována z bezvodého ethanolu²⁹. Bylo získáno 1.9 g (42 %) o t. t. 188 – 190 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.22 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.90 (d, *J* = 2.49 Hz, 1H), 8.85 – 8.81 (m, 1H), 7.91 (d, *J* = 0.73 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.50 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.51 Hz, 2H).

(*E*)-3-(4-hydroxyfenyl)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-en-1-on



5.00 g (0.041 mol) 4-hydroxybenzaldehydu bylo rozpuštěno v 10 ml pyridinu. Ke směsi bylo přidáno 4.96 g (0.041 mol) 3-acetylpyridinu a 3.00 g (0.041 mol) diethylaminu. Směs byla ponechána v uzavřené baňce při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin. Po uplynutí reakční doby byly za sníženého tlaku oddestilovány prchavé složky. Olejovitá látka, která zůstala po odpaření, byla rozetřena s vodou a vzniklé krystaly odfiltrovány a překrystalizovány z ethanolu³⁰. Bylo získáno 3.18 g (57 %) červeno-oranžových krystalů o t. t. 208 – 209 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.16 (s, 1H), 9.29 (t, *J* = 1.15, 1.07 Hz, 1H), 8.80 (d, *J* = 4.72 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 7.93 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 7.95, 4.84 Hz, 1H), 8.80 (d, *J* = 4.72 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.45 Hz, 2H), 7.73 (s, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.39 Hz, 2H).

4.1.1. Kvarternizace pyridinu a jeho derivátů

1-methylpyridinium-jodid (K001)

2.00 ml (0.025 mol) pyridinu bylo přidáno do 20 ml acetonu. Poté bylo přidáno k reakční směsi 1.5 ml (0.024 mol) methyljodidu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Ihned po přidání alkylačního činidla se začaly vylučovat žluté krystaly. Reakce byla ukončena po 7 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 4.2 g (75 %) žlutých krystalů, které po promytí etherem zbělaly. Přítomné nečistoty byly odstraněny rekrystalizací z butanolu a bylo získáno 3.7 g (66 %) bílých krystalů o t. t. 116 – 117 °C. TLC $R_f = 0.39$.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	32.60	3.65	6.34
nalezeno	32.55	3,90	6.13

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.99 (d, $J = 6.10$ Hz, 2H), 8.57 (t, $J = 7.82$, 7.82 Hz, 1H), 8.13 (t, $J = 6.96$, 6.96 Hz, 2H), 4.35 (s, 3H).

1,1'-methylendipyridinium-dibromid (K210)

2.00 ml (0.025 mol) pyridinu bylo přidáno do 25 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.029 mol) dibrommethanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 10 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 1.87 g (45 %) bílých krystalů. Po odkrystalování monokvarterního meziprojektu bylo získáno 1.44 g (34 %) biskvarterního produktu o t. t. 270 – 272 °C. TLC $R_f = 0.15$.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	39.79	3.64	8.44
nalezeno	38.01	4.22	7.98

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.64 (d, $J = 5.58$ Hz, 4H), 8.40 – 8.27 (m, 2H), 8.80 (t, $J = 7.82, 7.82$ Hz, 2H), 7.45 (s, 2H).

1,1'-(ethan-1,2-diyl)dipyridinium-dibromid (K211)

2.00 ml (0.025 mol) pyridinu bylo přidáno do 25 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.023 mol) 1,2-dibromethanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 15 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 2.16 g (46 %) bílých krystalů. Po odkrystalování monokvarterního meziprojektu bylo získáno 1.66 g (38 %) biskvarterního produktu o t. t. 302 – 303 °C. TLC $R_f = 0.18$.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	41.65	4.08	8.09
nalezeno	41.55	4.22	8.00

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.12 (d, $J = 5.78$ Hz, 4H), 8.68 (t, $J = 7.82, 7.82$ Hz, 2H), 8.21 (t, $J = 6.74, 6.74$ Hz, 4H), 5.32 (s, 4H).

1,1'-(propan-1,3-diyl)dipyridinium-dibromid (K212)

2.00 ml (0.025 mol) pyridinu bylo přidáno do 25 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.02 mol) 1,3-dibromopropanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 20 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 3.73 g (82 %) bílých krystalů. Po odkrystalování meziprojektu bylo získáno 3.23 g (71 %) biskvarterního produktu o t.t. 245 – 247 °C. TLC $R_f = 0.2$.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	43.36	4.48	7.78
nalezeno	43.37	4.67	7.80

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.98 (d, $J = 5.64$ Hz, 4H), 8.46 (t, $J = 7.81$, 7.81 Hz, 2H), 8.02 (dd, $J = 7.69$, 6.70 Hz, 4H), 4.58 (t, $J = 7.40$, 7.40 Hz, 4H) 2.49 (q, 2H).

1,1'-(butan-1,4-diyl)dipyridinium-dibromid (K213)

2.00 ml (0.025 mol) pyridinu bylo přidáno do 25 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.017 mol) 1,4-dibrombutanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 30 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 3.65 g (77 %) bílých krystalů. Po odkrystalování monokvarterního meziprojektu bylo získáno 3.04 g (64 %) biskvarterního produktu o t. t. 244 – 246 °C. TLC Rf = 0.21.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	44.95	4.85	7.49
nalezeno	42.56	5.15	7.14

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.16 (d, $J = 5.54$ Hz, 4H), 8.62 (t, $J = 7.81$, 7.81 Hz, 2H) 8.17 (dd, $J = 7.68$, 6.74 Hz, 4H) 4.71 (t, $J = 5.71$, 5.71 Hz, 4H), 1.96 (q, 4H).

1,1'-(pentan-1,5-diyl)dipyridinium-dibromid (K214)

2.00 ml (0.025 mol) pyridinu bylo přidáno do 25 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.015 mol) 1,5-dibrompentanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 8 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 1.84 g (38 %) bílých krystalů. Po odkrystalování meziprojektu bylo získáno 0.84 g (17 %) biskvarterního produktu o t. t. 197.5 – 199 °C. TLC Rf = 0.28.

Elementární analýza	%C	%H	%N
---------------------	----	----	----

vypočteno	46.42	5.19	7.22
nalezeno	46.13	5.42	7.05

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.17 (d, J = 5.72 Hz, 4H), 8.62 (t, J = 7.76, 7.76 Hz, 2H), 8.26 – 8.12 (m, 4H), 4.64 (t, J = 7.39, 7.39 Hz, 4H), 2.06 – 1.90 (m, 4H), 1.29 (m, 2H).

1,1'-(hexan-1,6-diyl)dipyridinium-dibromid (K215)

2.00 ml (0.025 mol) pyridinu bylo přidáno do 25 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2 ml (0.013 mol) 1,6-dibromhexanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 10 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 3.25 g (64 %) bílých krystalů. Po odkrystalování meziprojektu bylo získáno 2.73 g (54 %) biskvarterního produktu o t. t. 243 – 246 °C. TLC R_f = 0.29.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	47.78	5.51	6.97
nalezeno	47.29	5.71	6.83

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.18 (s, 4H), 8.61 (t, J = 6.84, 6.84 Hz, 2H), 8.17 (t, J = 6.18, 6.18 Hz, 4H), 4.63 (t, J = 6.48, 6.48 Hz, 4H), 1.91 (s, 4H), 1.31 (s, 4H).

3-acetyl-1-methylpyridinium-jodid (K216)

1.00 g (8.25 mmol) 3-acetylpyridinu bylo přidáno do 20 ml acetonu. Poté bylo k reakční směsi přidáno 1.5 ml (0.024 mol) methyljodidu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Po několika minutách začaly vypadávat krystaly. Reakce byla ukončena po 2 hodinách, krystaly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 1.37 g (63 %) žlutých krystalů o t.t. 161 – 163 °C. TLC R_f = 0.43.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	36.52	3.83	5.32
nalezeno	36.28	4.03	5.24

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.54 (s, 1H), 9.15 (d, $J = 5.87$ Hz, 1H), 8.97 (dd, $J = 8.09, 1.34$ Hz, 1H), 8.27 (dd, $J = 8.02, 6.15$ Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 2.72 (s, 1H).

1,1'-methylenbis(3-acetylpyridinium)-dibromid (K217)

2.00 ml 3-acetylpyridinu (0.017 mol) bylo přidáno do 40 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.029 mol) dibrommethanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 35 hodinách. Produkt byl v roztoku detekován pomocí TLC, avšak krystaly se z roztoku nevyloučily. Proto byla reakční směs částečně oddestilována (na poloviční objem) a ke směsi byl přidán ether. Vypadlé krystaly byly zfiltrvány a vysušeny. Bylo získáno 0.15g (4 %) krystalů o t. t. 176 – 177 °C. TLC Rf = 0.35.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.81 (s, 2H), 9.31 (s, 2H) 9.12 (s, 2H), 8.36 (s, 2H), 5.80 (s, 2H).

1,1'-(ethan-1,2-diyl)bis(3-acetylpyridinium)-dibromid (K218)

2.00 ml 3-acetylpyridinu (0.017 mol) bylo přidáno do 40 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.023 mol) dibrommethanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 35 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 0.98 g (28 %) světle hnědých krystalů. Po odkrystalování monokvarterního meziproductu bylo získáno 0.13 g (4 %) čisté látky o t. t. 286 – 287 °C. TLC Rf = 0.18.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	44.68	4.22	6.51

nalezeno	43.96	4.43	6.40
----------	-------	------	------

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.77 (s, 2H), 9.25 (s, 2H) 9.10 (s, 2H), 8.36 (s, 2H), 5.80 (s, 4H).

1,1'-(propan-1,3-diyl)bis(3-acetylpyridinium)-dibromid (K219)

2.00 ml 3-acetylpyridinu (0.017 mol) přidáno do 40 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.02 mol) 1,3-dibrompropanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 35 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 2.52 g (69 %) bílých krystalů. Po odkrystalování monokvarterního meziprojektu bylo získáno 0.72 g (19 %) čisté látky o t.t. 196 – 198 °C. TLC Rf = 0.33.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	45.97	4.54	6.31
nalezeno	44.57	4.89	6.02

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.71 (s, 2H), 9.36 (d, J = 6.10 Hz, 2H), 9.05 (d, J = 8.16 Hz, 2H), 8.35 (dd, J = 8.00, 6.19 Hz, 2H), 4.89 (t, J = 7.24, 7.24 Hz, 4H), 3.51 (s, 4H).

1,1'-(butan-1,4-diyl)bis(3-acetylpyridinium)-dibromid (K220)

2.00 ml 3-acetylpyridinu (0.017 mol) bylo přidáno do 40 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.017 mol) 1,4-dibrombutanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 35 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 1.53 g (40 %) světle hnědých krystalů. Po odkrystalování monokvarterního meziprojektu bylo získáno 0,82 g (21 %) čisté látky o t. t. 237 – 238 °C. TLC Rf = 0.33.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.64 (s, 2H), 9.28 (d, $J = 5.95$ Hz, 2H), 9.02 (d, $J = 8.12$ Hz, 2H), 8.32 (dd, $J = 8.01, 6.15$ Hz, 2H), 4.77 (t, $J = 5.59, 5.59$ Hz, 4H), 2.74 (s, 4H).

1,1'-(pentan-1,5-diyl)bis(3-acetylpyridinium)-dibromid (K221)

2.00 ml 3-acetylpyridinu (0.017 mol) bylo přidáno do 40 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.015 mol) 1,5-dibrompentanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 35 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 2.5 g (64 %) bílých krystalů. Po odkrystalování monokvarterního meziprojektu bylo získáno 0.43 g (11 %) čisté látky o t. t. 193 °C. TLC $R_f = 0.20$.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	48.33	5.12	5.93
nalezeno	47.64	5.32	5.82

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.74 (s, 2H), 9.41 (d, $J = 6.07$ Hz, 2H), 9.00 (dd, $J = 8.11, 1.14$ Hz, 2H), 8.32 (dd, $J = 5.05, 2.95$ Hz, 2H), 4.83-4.73 (m, 4H), 1.98 (s, 4H), 1.41 (s, 2H).

1,1'-(hexan-1,6-diyl)bis(3-acetylpyridinium)-dibromid (K222)

2.00 ml 3-acetylpyridinu (0.017 mol) bylo přidáno do 40 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 2 ml (0.013 mol) 1,6-dibromhexanu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 35 hodinách. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 2.36 g (59 %) světle hnědých krystalů. Po odkrystalování meziprojektu bylo získáno 0.13 g (3 %) čisté látky o t. t. 173 – 173 °C. TLC $R_f = 0.23$.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	49.40	5.39	5.76
nalezeno	48.60	5.59	5.70

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.69 (s, 2H), 9.35 (d, $J = 5.86$ Hz, 2H), 8.99 (d, $J = 7.95$ Hz, 2H), 8.35 – 8.25 (m, 2H), 4.74 (t, $J = 7.31, 7.31$ Hz, 4H), 1.96 (s, 4H), 1.36 (s, 4H).

(*E*)-3-[3-(4-hydroxyfenyl)akryloyl]-1-methylpyrazin-1-ium-jodid (K223)

400 mg (1.78 mmol) (*E*)-3-(4-hydroxyfenyl)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-en-1-onu bylo rozpuštěno v 20 ml acetonu. Poté bylo k reakční směsi přidáno 1.5 ml (0.024 mol) methyljodidu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 7 hodinách, krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 0.57 g (87 %) žlutých krystalů o t. t. 250 – 252 °C. TLC $R_f = 0.54$.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	49.07	3.84	3.81
nalezeno	48.34	4.09	3.78

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.33 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 9.14 (d, $J = 9.38$ Hz, 2H), 8.29 (t, $J = 7.09, 7.09$ Hz, 1H), 4.44 (s, 3H), 7.83 (d, $J = 7.99$ Hz, 2H), 7.79 (dd, $J = 3.57, 1.15$ Hz, 2H), 6.91 – 6.85 (m, 1H), 4.44 (s, 3H).

Biskvarterní deriváty azachalkonů se nepodařilo připravit za podmínek uvedených v tabulce (tabulka 1). Dle TLC byla přítomna jen výchozí látka.

Tabulka 1: Podmínky reakce

Číslo reakce	Rozpouštědlo	Teplota	Čas (h)
1	Acetonitril	laboratorní teplota	240
2	Dimethylformamid	laboratorní teplota	240
3	Acetonitril	reflux	120
4	Dimethylformamid	80 °C	120

4.1.2. Kvarternizace pyrazinu a jeho derivátů

1-methylpyrazin-1-ium-jodid (K015)

2.00 g (0.025 mol) pyrazinu bylo rozpuštěno v 25 ml acetonu. Poté bylo přidáno k reakční směsi 1.5 ml (0.024 mol) methyljodidu a směs byla nechána za stálého míchání a pod refluxem. Po několika minutách začaly vznikat první krystaly. Reakce byla ukončena po 7 hodinách, krystaly odfiltrovány a promyty 50 ml etheru. Bylo získáno 3.17 g (57 %) žlutých krystalů o t. t. 142 °C. TLC R_f = 0.27.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	27.05	3.18	12.62
nalezeno	26.98	3.45	12.48

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.51 (td, *J* = 5.07, 2.65, 2.65 Hz, 2H), 9.16 (d, *J* = 3.65 Hz, 2H), 4.39 (s, 3H).

1,1'-methylendipyrazin-1-ium-dibromid (K224)

2.00 g (0.025 mol) pyrazinu bylo rozpuštěno ve 30 ml dimethylformamidu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.029 mol) dibrommethanu a směs byla nechána za stálého míchání při teplotě 80 °C. Reakce byla ukončena po 7 hodinách, směs byla částečně oddestilována (na poloviční objem) a ke směsi byl přidán ether. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a vysušeny. Bylo získáno 0.07 g (2 %) hnědých krystalů. TLC R_f = 0.06.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.64 (s, 4H), 9.32 (d, *J* = 4.54 Hz, 4H), 5.54 (s, 4H).

1,1'-(ethan-1,2-diy)l) dipyrazin-1-ium-dibromid (K225)

2.00 g (0.025 mol) pyrazinu bylo rozpuštěno ve 30 ml dimethylformamidu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.023 mol) 1,2-dibromethanu a směs byla nechána za stálého míchání při teplotě 80 °C. Po 20 hodinách byla reakce ukončena. Vypadlé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 0.10 g (2 %) černých krystalů. TLC R_f = 0.04.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	34.51	3.48	16.10
nalezeno	35.90	4.65	13.12

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.63 (s, 4H), 9.29 (d, *J* = 4.54 Hz, 4H), 5.35 (s, 4H).

1,1'-(propan-1,3-diyl)dipyrazin-1-ium-dibromid (K226)

2.00 g (0.025 mol) pyrazinu bylo rozpuštěno ve 30 ml dimethylformamidu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.02 mol) 1,3-dibrompropanu a směs byla nechána za stálého míchání při teplotě 80 °C. Reakce byla ukončena po 30 hodinách. Vypadlé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 3.1 g (69 %) černých krystalů. Po odkrystalování meziprojektu bylo získáno 1.9 g (42 %) biskvarterního produktu, který při 197 °C zuhelnatěl. TLC R_f = 0.04.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	36.49	3.90	15.47
nalezeno	36.17	4.34	14.24

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.60 (s, 4H), 9.34 (d, *J* = 4.43 Hz, 4H), 4.83 (t, *J* = 7.10, 7.10 Hz, 4H), 2.74 (q, 2H).

1,1'-(butan-1,4-diyl)dipyrazin-1-ium-dibromid (K227)

2.00 g (0.025 mol) pyrazinu bylo rozpuštěno ve 30 ml dimethylformamidu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.017 mol) 1,3-dibrombutanu a směs byla nechána za stálého míchání při teplotě 80 °C. Reakce byla ukončena po 30 hodinách. Vypadlé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 4,11 g (87 %) černých krystalů. Po odkrystalování meziprojektu bylo získáno 2,58 g (55 %) biskvarterního produktu, který při 210 – 212 °C zuhelnatěl. TLC R_f = 0.06.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	38.32	4.29	14.90
nalezeno	37.41	4.51	14.37

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.57 (d, J = 2.51 Hz, 4H), 9.27 (d, J = 3.95 Hz, 4H), 4.73 (t, J = 5.51, 5.51 Hz, 4H), 2.03 (s, 4H).

1,1'-(pentan-1,5-diyl)dipyrazin-1-ium-dibromid (K228)

2.00 g (0.025 mol) pyrazinu bylo rozpuštěno ve 30 ml dimethylformamidu. Poté byly k reakční směsi přidány 2.00 ml (0.015 mol) 1,5-dibrompentanu a směs byla nechána za stálého míchání při teplotě 80 °C. Reakce byla ukončena po 37 hodinách. Vypadlé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 4,28 g (88 %) černých krystalů. Po odkrystalování meziprojektu bylo získáno 3.35 g (69 %) biskvarterního produktu. TLC R_f = 0.06.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	40.02	4.65	14.36
nalezeno	40.21	5.23	11.43

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.56 (d, J = 4.19 Hz, 4H), 9.32 (d, J = 4.54 Hz, 4H), 4.69 (t, J = 7.43, 7.43 Hz, 4H), 2.08 – 1.95 (m, 4H) 1.37 (m, 2H).

1,1'-(hexan-1,6-diyl)dipyrazin-1-ium-dibromid (K229)

2.00 g (0.025 mol) pyrazinu bylo rozpuštěno ve 30 ml dimethylformamidu. Poté byly k reakční směsi přidány 3.00 ml (0.02 mol) 1,3-dibromhexanu a směs byla nechána za stálého míchání při teplotě 80 °C. Reakce byla ukončena po 30 hodinách. Vypadlé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 0.71 g (14 %) hnědých krystalů. Po odkrystalování monokvarterního meziprojektu bylo získáno 0.44 g (9 %) biskvarterního produktu. TLC R_f = 0.14.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	41.61	4.99	13.86
nalezeno	38.82	5.2	12.05

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.55 (d, $J = 3.20$ Hz, 4H), 9.36 (d, $J = 3.52$ Hz, 4H), 4.71 (t, $J = 7.48$, 7.48 Hz, 4H), 1.97 (q, 4H) 1.37 (q, 4H).

3-acetyl-1-methylpyrazin-1-ium-jodid (K050)

0.84 g (6.87 mmol) acetylpyrazinu bylo rozpuštěno ve 100 ml acetonitrilu. Poté byly k reakční směsi přidány 3.00 ml methyljodidu (0.048 mol) a směs byla nechána za stálého míchání při laboratorní teplotě 120 hodin. Poté bylo přidáno 50 ml etheru a vyloučené krystaly odfiltrovány. Bylo získáno 0.24 g (13 %) hnědých krystalů. TLC $R_f = 0.40$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.63 (s, 1H), 9.61 (d, $J = 0.88$ Hz, 1H), 9.33 (d, $J = 3.22$ Hz, 1H), 4.48 (s, 3H).

Biskvarterní acetylpyraziny se nepodařilo připravit za podmínek uvedených v tabulce. Dle TLC byla přítomna jen výchozí látka.

Tabulka 2: Podmínky reakce

Reakce číslo	Rozpouštědlo	Teplota	Čas (h)
1	Acetonitril	laboratorní teplota	240
2	Ethanol	laboratorní teplota	240
3	Dimethylformamid	laboratorní teplota	240
4	Dimethylsulfoxid	laboratorní teplota	240
5	Acetonitril	reflux	150
6	Ethanol	reflux	150
7	Dimethylformamid	80 °C	150
8	Dimethylsulfoxid	80 °C	150

(E)-3-[3-(4-hydroxyfenyl)akryloyl]-1-methylpyrazin-1-ium-jodid (K230)

0.50 g (*E*)-3-(4-hydroxyfenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-onu (2.21 mmol) bylo rozpuštěno v 20 ml acetonu. Poté bylo k reakční směsi přidáno 1.5 ml (0.024 mol) methyljodidu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 10 hodinách. Vypadlé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 0.15 g (18 %) černých krystalů. Dle NMR byly přítomny nečistoty. Po rekrystalizaci produktu bylo získáno 0.23 g (28 %) oranžových krystalů o t. t. 205 – 207 °C. TLC Rf = 0.54.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	45.67	3.56	7.61
nalezeno	44.97	3.75	7.49

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.39 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 9.63 (d, *J* = 3.31 Hz, 1H), 9.34 (d, *J* = 3.48 Hz, 1H) 7.98 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.69 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.68 Hz, 2H) 4.50 (s, 3H).

(E)-3-[3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)akryloyl]-1-methylpyrazin-1-ium-jodid (K232)

200 mg (*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-onu (0.78 mmol) bylo rozpuštěno v 20 ml acetonu. Poté byly k reakční směsi přidány 0.2 ml (0.03 mol) methyljodidu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 4 hodinách. Vypadlé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 0.036 g (12 %) oranžových krystalů o t. t. 169 – 171 °C. TLC Rf = 0.47.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	45.24	3.80	7.04
nalezeno	43.22	4.10	6.76

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.05 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 9.63 (d, *J* = 3.56 Hz, 1H), 9.32 (d, *J* = 3.41 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.85 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 1.74

Hz, 1H), 7.37 (dd, $J = 8.18, 2.07$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 8.17$ Hz, 1H), 4.50 (s, 3H), 3.86 (s, 3H).

(*E*)-3-{3-[4-(dimethylamino)fenyl]akryloyl}-1-methylpyrazin-1-ium-jodid (K231)

90 mg (0.35 mmol) (*E*)-3-[4-(dimethylamino)fenyl]-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-onu bylo rozpuštěno v 20 ml acetonu. Poté byly k reakční směsi přidány 0.2 ml (0.03 mol) methyljodidu a směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Reakce byla ukončena po 10 hodinách. Vypadlé krystaly byly odfiltrovány a promyty etherem. Bylo získáno 0.06 g (43 %) hnědých krystalů. Dle NMR byly přítomny nečistoty. Po rekrystalizaci produktu bylo získáno 0.02 g látky (14 %) o t. t. 169 – 171 °C. $R_f = 0.47$ a 0.54. Dle TLC i NMR jsou přítomny 2 kvarterní produkty, které se nepodařilo oddělit.

Elementární analýza	%C	%H	%N
vypočteno	48.62	4.59	10.63
nalezeno	46.10	4.81	9.91

Biskvarterní deriváty diazachalkonů se nepodařilo připravit za podmínek uvedených v tabulce. Dle TLC byla přítomna jen výchozí látka.

Tabulka 3: Podmínky reakce

Číslo reakce	Rozpouštědlo	Teplota	Čas (h)
1	Acetonitril	laboratorní teplota	240
2	Dimethylformamid	laboratorní teplota	240
3	Acetonitril	reflux	120
4	Dimethylformamid	80 °C	120

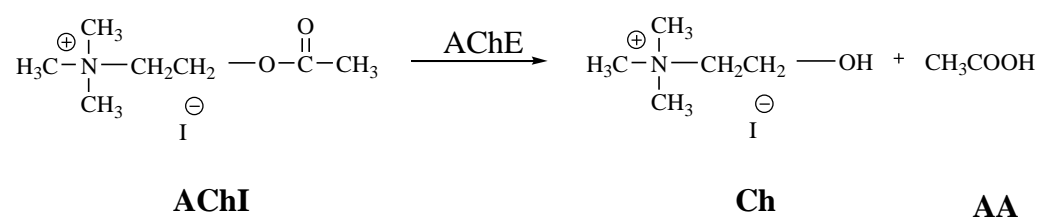
4.2 Biochemická část

4.2.1 Princip stanovení afinity inhibitorů k AChE

Afinita syntetizovaných látek k enzymu (AChE) byla testována standardním *in vitro* pokusem³¹. Byl sledován vliv koncentrace testované látky v reakčním médiu na aktivitu AChE. Afinita heteroareniových solí k AChE je reprezentována disociační konstantou komplexu enzym-inhibitor komplexu (K_{DIS}). Vyšší hodnota K_{DIS} odpovídá úbytku afinity heteroareniových solí k enzymu.

Enzym AChE štěpí přidaný substrát – acetylcholin-jodid (AChI) za vzniku cholinu (Ch) a kyseliny octové (AA) (Schéma7).

Schéma 7: Štěpení substrátu enzymem



Pomocí titrátoru je udržováno pH reakční směsi na hodnotě 8 dotitrováním uvolněné kyseliny octové roztokem NaOH. Spotřeba NaOH je úměrná množství kyseliny octové, která vznikla rozkladem AChI enzymem (AChE). Při reakci AChE s inhibitorem se snižuje aktivita enzymu. Je-li aktivita AChE snížena, sníží se i množství kyseliny octové vzniklé při rozkladu AChI a tím i spotřeba roztoku NaOH.

4.2.2 Experimentální stanovení afinity inhibitorů k AChE

Chemikálie

Enzym: Jako zdroj enzymu byl použit 10% (w/v) homogenát mozku bílého laboratorního potkana (kmen Wistar). Uspaná zvířata byla usmrcena vykvrvením z karotidy a mozek byl vyjmut a opláchnut studeným fyziologickým roztokem. Homogenizace byla provedena v destilované vodě pomocí Ultra-turrax homogenizéru při 20000 ot./min. po dobu 1 min. 2 ml tohoto homogenátu byly vloženy do zkumavek a byly uchovány při -35 °C. Rozmrazeny byly až těsně před použitím.

Roztoky: Byl připraven 0.01 M roztok NaOH na titraci kyseliny octové, 0.02 M roztok acetylcholin-jodidu (AChI) a 3 M roztok NaCl.

Vlastní postup měření

K 0.200 ml roztoku heteroareniových solí o dané koncentraci (od 10^{-7} do 10^{-1} mol/dm³) bylo přidáno 19.8 ml vody, 2.5 ml roztoku chloridu sodného a 0.5 ml homogenátu potkaního mozku. Potom byly přidány 2.00 ml roztoku substrátu – acetylcholin-jodidu. Enzymová aktivita byla zjištěna pomocí automatického titrátoru RTS 822 (Radiometer Copenhagen) složeného z pH metru, automatického titrátoru a zapisovače.

Výpočty

Aktivity intaktního (a_0) a kvarterní látkou inhibovaného (a_i) enzymu byly odečteny ze závislosti spotřeby roztoku hydroxidu sodného na čase, která je přímo úměrná titrované kyselině octové uvolněné hydrolýzou acetylcholinu.

Z naměřených hodnot aktivit bylo vypočítáno procento inhibice AChE podle vzorce:

$$x = a_i / a_0 \quad (\%) \quad \text{vzorec 1}$$

Disociační konstanta (K_{DIS}) byla získána nelineární regresí ze závislosti enzymové aktivity na koncentraci heteroareniových solí. Pro výpočet byl použit program GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

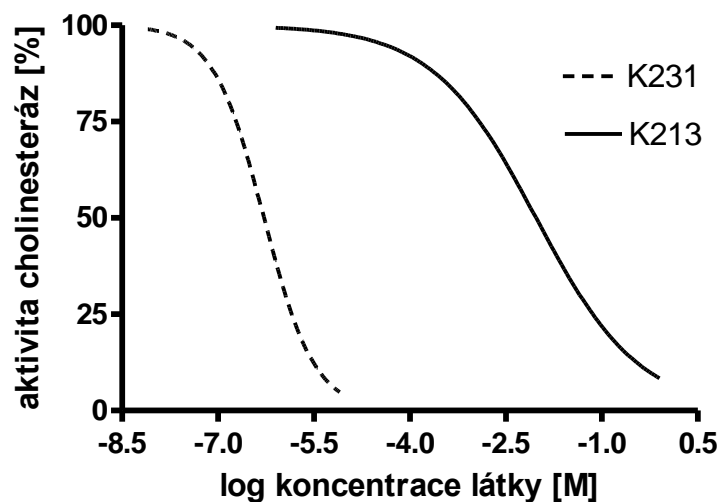
5. Výsledky a diskuse

Všechny testované heteroareniové soli byly shledány reverzibilními inhibitory acetylcholinesterasy. Jejich disociační konstanty reprezentují jejich afinity k enzymu. Ve všech případech byly získány *sigmoidal dose-response* křivky. Disociační konstanty (K_{DIS}) všech testovaných heteroareniových inhibitorů jsou udány v tabulce 4. Byly testovány i výchozí nekvarterní látky, které neměly inhibiční schopnosti s výjimkou acetylpyridinu a acetylpyrazinu.

Tabulka 4: Disociační konstanty

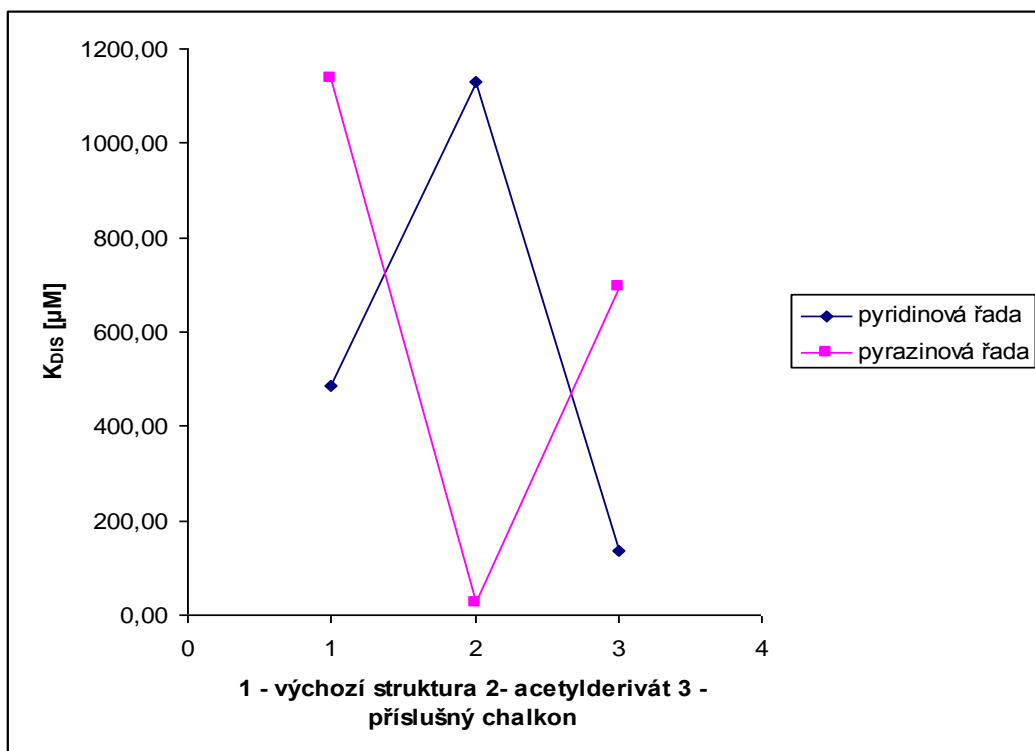
látka	K_{DIS} [μM]	látka	K_{DIS} [μM]
pyridin	neinhiboval	pyrazin	neinhiboval
K001	487.5	K015	1138.0
K210	7421.0	K224	neměřeno
K211	7463.0	K225	11.6
K212	7062.0	K226	79.7
K213	11770.0	K227	110.5
K214	1738.0	K228	37.6
K215	213.3	K229	4.4
acetylpyridin	5725.0	acetylpyrazin	1875.0
K216	1130.0	K050	24.9
K217	41.3		
K218	1130.0		
K219	433.0		
K220	887.2		
K221	135.0	diazachalkon	neinhiboval
K222	23.4	K230	694.1
azachalkon	neinhiboval	K231	0.5
K223	126.6	K232	675.1

Graf č. 1: Závislost aktivity AChE na koncentraci inhibitoru

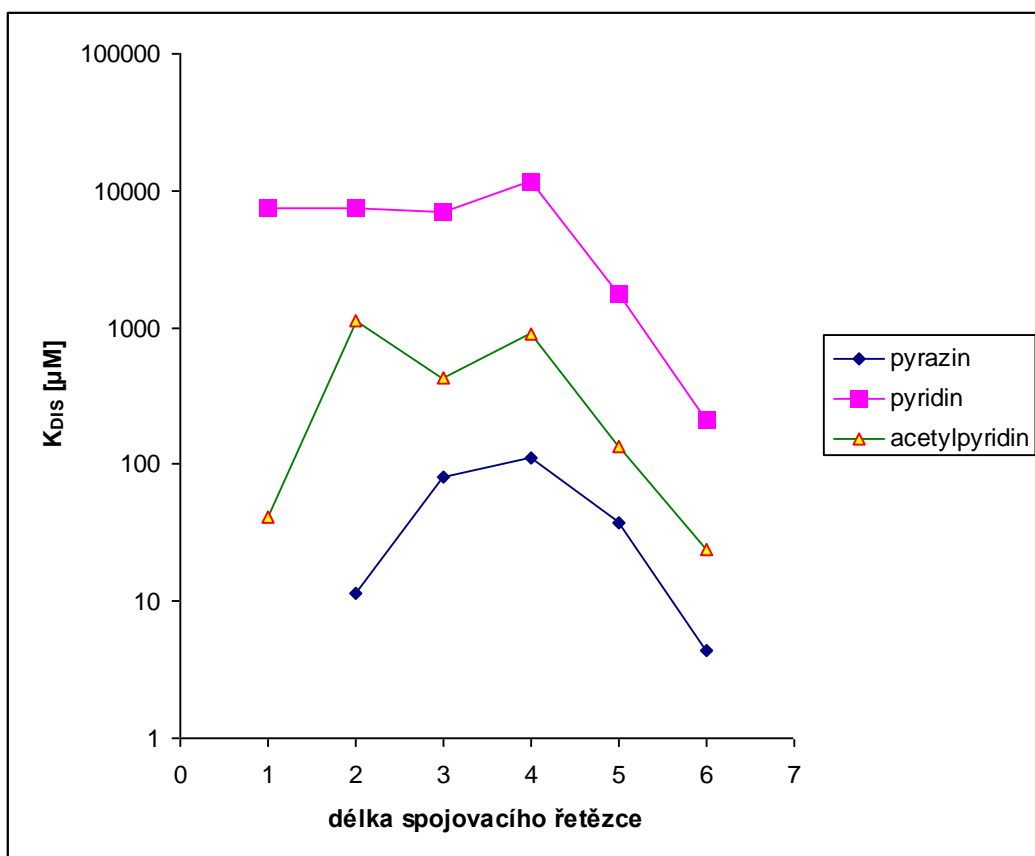


Na základě získaných hodnot byla sledována závislost inhibičních schopností na struktuře. U monokvarterních látek můžeme porovnávat inhibiční účinek v řadě – pyridin, acetylpyridin a azachalkon a v sérii pyrazin, acetylpyrazin a diazachalkon (graf č. 2), dále můžeme porovnávat jednotlivé analogické deriváty pyridin – pyrazin, acetylpyridin – acetylpyrazin a azachalkon – diazachalkon (graf č. 1 a č. 2). U biskvarterních struktur můžeme sledovat závislost disociační konstanty na délce spojovacího řetězce a dále porovnat mezi sebou jednotlivé deriváty (graf č. 3).

Graf č. 2: Závislost disociační konstanty na charakteru derivátu.

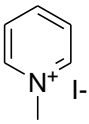
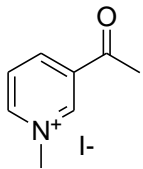
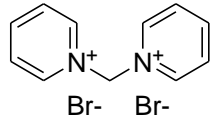
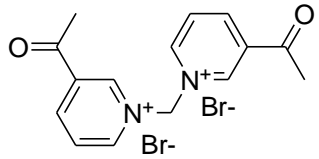
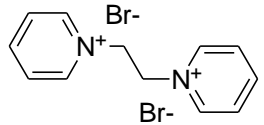
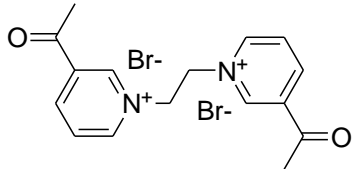
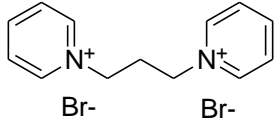
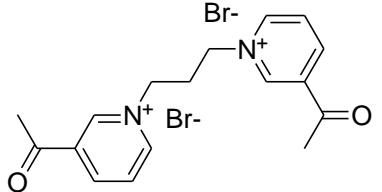
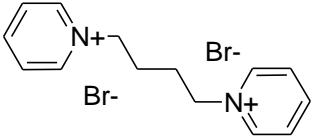
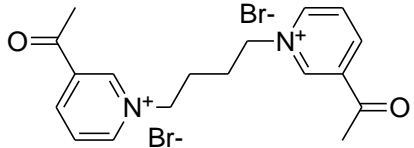
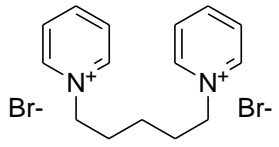
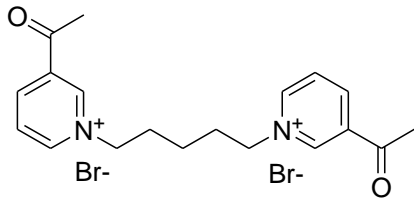
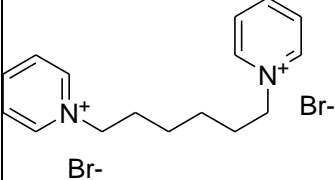
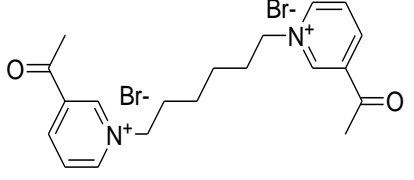


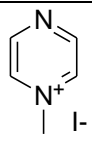
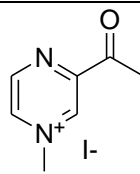
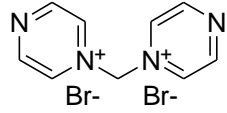
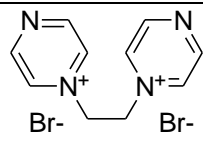
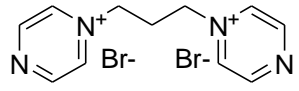
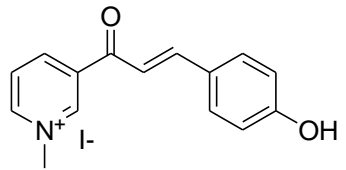
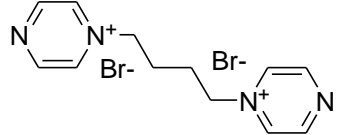
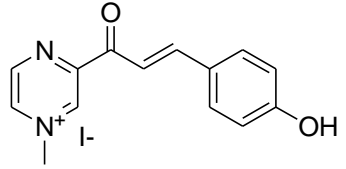
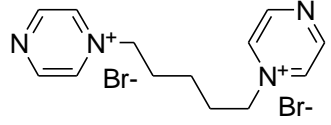
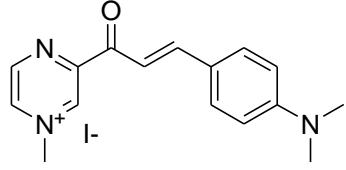
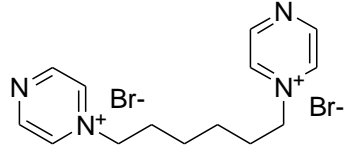
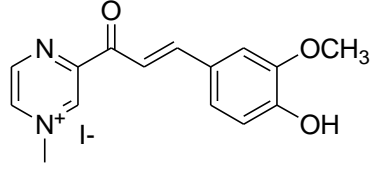
Graf č. 3: Závislost disociační konstanty na délce spojovacího řetězce.



U monokvarterních látek nebyla žádná závislost zjištěna. Určitá závislost na délce spojovacího řetězce se vyskytuje u pyrazinů, kde nejmenší inhibiční schopnosti mají deriváty s 3 a 4 uhlíkatým řetězcem. Se zkracujícím se i prodlužujícím se řetězcem pak jejich inhibiční schopnosti rostou. Tuto závislost ovšem nelze prokázat u pyridinu, ani u acetylpyridinu. Biskvarterní acetylpyrazin se bohužel připravit nepodařilo. Můžeme též říci, že od 4 uhlíkatého spojovacího řetězce se s růstem spojovacího řetězce zvyšují i inhibiční schopnosti. Nejúčinnějším inhibitorem ze syntetizovaných látek je kvarterní diazachalkon s dimethylaminoskupinu na fenylu, dle NMR i TLC se jedná o směs, kterou se nepodařilo rozdělit. V budoucnu by stálo za to, zjistit, která z látek přítomná v této směsi je silnější inhibitor.

Tabulka č. 5: Struktury syntetizovaných látek

látka	struktura	látka	struktura
K001		K216	
K210		K217	
K211		K218	
K212		K219	
K213		K220	
K214		K221	
K215		K222	

látka	struktura	látka	struktura
K015		K050	
K224			
K225			
K226		K223	
K227		K230	
K228		K231	
K229		K232	

6. Literatura

- ¹ Masssoulie J., Sussman J., Bon S., Stilman I.: Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog. Brain Res.* 1993; 98: 139-146.
- ² Lockridge O., Bartels C.F., Vaughan T.A., Wong C.K., Norton S.E., Johnson L.L.: Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 549-557.
- ³ Boeck R., Fry D.L., Sastre A., Lockridge O.: Naturally occurring mutation, Asp70His, in human butyrylcholinesterase. *Ann. Clin. Biochem.* 2002; 39: 154-156.
- ⁴ Katzung B.G.: *Základní & klinická farmakologie*, Nakladatelství a vydavatelství H & H 1994, s. 72.
- ⁵ Sussman J. L., Harel M., Frolow F., Oefner Ch., Goldman A., Toker L., Silman I.: Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: an aprotic acetylcholin-binding protein. *Science* 1991; 253: 872-879.
- ⁶ Majewski M., Sefarin B.: *Wiad. Chem.* 1979; 33: 75.
- ⁷ Leuzinger W.: The number of catalytic sites in acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 1971; 123: 139-141.
- ⁸ Berry W. K.: The turnover number of cholinesterase. *Biochem. J.* 1951; 49: 615-620.
- ⁹ Barak D., Ordentlich A., Bromberg A., Kronman C., Marcus D., Lazar A., Ariel N., Velan B., Shafferman A.: *Biochemistry* 1995; 34: 15444–15452.
- ¹⁰ Lincová D, Farghali H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén 2002; s. 98-109.
- ¹¹ Lullmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*, Grada 2003; s. 92-93.
- ¹² Ellin R. I., Wills J. H.: Oximes antagonistic to inhibitors of cholinesterase. *J. Pharm. Sci.* 1964; 53: 995.
- ¹³ Kassa J., Krs O., Cabal J.: *Základy vojenské toxikologie a ochrany proti BCHL*, VLA JEP Hradec Králové 1993; s. 12-14.
- ¹⁴ Reiner E., Plestina R.: Regeneration of cholinesterase activities in humans and rats after inhibition by *O,O*-dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1979; 49: 451-454.

-
- ¹⁵ Wilson I.B., Bergmann F., Nachmansohn D.: Acetylcholinesterase X. Mechanism of the catalysis of acylation reactions. *J. Biol. Chem.* 1950; 186: 781-790.
- ¹⁶ Katzung B.G.: *Základní & klinická farmakologie*, Nakladatelství a vydavatelství H & H 1994, s. 103.
- ¹⁷ Bird T., Schellenberg G.D., Wijsman E.H., Martin G.M.: Evidence for etiologic heterogeneity in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 1989; 10: 432-434.
- ¹⁸ Patočka J., Řípková D.: Od objevu Alzheimerovy choroby uplynulo 90 let. *Psychiatrie* 1998; 2: 46-48.
- ¹⁹ Perry E.K.: The cholinergic system in old age and Alzheimer's disease. *Age Aging* 1980; 9: 1-8.
- ²⁰ Foster N.L., Tamminga C.A., O'Donohue T.L., Tanimoto K., Bird E.D., Chase T.N.: Brain choline acetyltransferase activity and neuropeptide Y concentrations in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1986; 63: 71-75.
- ²¹ Bartus R.T., Dean III R.L., Beer P., Lippa A.S.: The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982; 217: 408-417.
- ²² Whitehouse P.J., Price D.L., Clark A., Coyle J.T., DeJong M.R.: Alzheimer's disease: Evidence for a selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* 1981; 10: 122-126.
- ²³ Knopman D., Schneider L., Davis K., Gracon S., Smith F.: Long-term tacrine treatment effects. *Neurology* 1998; 50: 567-568.
- ²⁴ Rogers S.L., Farlow M.R., Doody R.S., Mohs R., Friedhoff L.T.: A 24-week, double-blind, placebo controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology* 1998; 50: 136-145.
- ²⁵ Marx J.: Searching for drugs that combat Alzheimer's disease. *Science* 1996; 273: 50-53.
- ²⁶ Štancl A., Šentjurc M.: A contribution to the mechanism of action of SAD-128. *Biochem. Pharmacol.* 1990; 11: 2511-2517.
- ²⁷ Alptuzun V, Kapková P., Baumann K., Erciyas E., Holzgrabe U.: Synthesis and biological activity of pyridinium-type acetylcholinesterase inhibitors. *J. Pharm. and Pharmacol.* 2003; 55: 1397-1404.
- ²⁸ Ayers J.T., Dwoskin L.P., Deaciuc A.G., Grinevich V.P., Zhu J., Crooks P.A.: Bis-Azaaromatic quaternary ammonium analogues: ligands for $\alpha 4\beta 2^*$ and $\alpha 7^*$

subtypes of neuronal nicotinic receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002; 12: 3067-3071.

²⁹ Opletalová V., Hartl J., Patel A., Palát K., Buchta V.: Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents. *Farmaco* 2002; 57: 135-144.

³⁰ Szucs L., Durinda J., Krasnec L., Heger J.: Príspevok k chémii α,β -nenasýtených ketónov odvodených od acetylpyridínov. *Chem. zvesti* 1966; 20: 817-825.

³¹ Kuča K., Cabal J., Patočka J., Dohnal V.: Quarternary heteroarenium salts as the competitive inhibitors of the brain acetylcholinesterase. *Lett. Drug Des. Discov.* 2004; 1, 35-44.