

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

PŘÍPRAVA NOVÝCH REAKTIVÁTORŮ
ACETYLCHOLINESTERASY S RŮZNÝMI TYPY SPOJOVACÍHO
ŘETĚZCE MEZI PYRIDINIOVÝMI JÁDRY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Jan Hambálek

Hradec Králové, 2008

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně pod vedením školitele a použil jen prameny uvedené v seznamu literatury.

Hradec Králové, 2008

Jan Hambálek

Děkuji Doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. a Mgr. Kamilu Musílkovi, Ph.D. za cenné rady při realizaci této diplomové práce.

Příprava nových reaktivátorů acetylcholinesterasy s různými typy spojovacího řetězce mezi pyridiniovými jádry

Souhrn

Bylo připraveno šest nových biskvarterních reaktivátorů acetylcholinesterasy s alifatickým spojovacím řetězcem a devět nových reaktivátorů s xylenovým spojovacím řetězcem mezi pyridiniovými jádry. Jejich účinnost reaktivovat AChE inhibovanou nervově paralytickou látkou tabunem a insekticidem paraoxonem byla měřena *in vitro*. Jako referenční sloučeniny byly zvoleny pralidoxim, HI-6 a obidoxim. Z výsledků vyplynulo, že celkem šest sloučenin je schopno reaktivovat paraoxonem inhibovanou AChE při obou zvolených koncentracích. Dále bylo prokázáno, že reaktivační účinek vykazují i sloučeniny s jednou hydroxyiminomethylovou skupinou v sérii s xylenovým řetězcem při srovnání s bisoximovými sloučeninami. U sloučenin s alifatickým řetězcem klesá účinnost s rostoucí délkou spojovacího řetězce. Žádná z testovaných sloučenin neprokázala reaktivační schopnost pro tabunem inhibované AChE.

Synthesis of novel acetylcholinesterase reactivators bearing various linkers between two pyridinium rings

Summary

Six novel bispyridinium AChE reactivators with aliphatic linker and nine novel reactivators with xylene linker were synthesized. Their ability to reactivate AChE inhibited by nerve agent tabun and insecticide paraoxon was tested *in vitro*. pralidoxime, HI-6 a obidoxime were chosen as reference compounds. Regarding the obtained results, six compounds seem to be potent reactivators of paraoxon-inhibited AChE for both chosen concentration. Furthermore, there is evidence that compounds with only one hydroxyiminomethyl group with xylene linker have also reactivation ability compared to bisoxime compounds. Reactivation potency is decreasing with increasing length of the aliphatic linker. None of the tested compounds was able to reactivate tabun-inhibited AChE.

Obsah

Seznam zkratk	6
1 Úvod.....	7
2 Teoretická část	8
2.1 Cholinesterasa	8
2.1.1 Butyrylcholinesterasa.....	8
2.1.2 Acetylcholinesterasa	8
2.1.3 Acetylcholinové receptory	9
2.1.4 Vlastnosti acetylcholinesterasy	10
2.2 Inhibice acetylcholinesterasy	12
2.2.1 Rozdělení inhibitorů acetylcholinesterasy	12
2.2.2 Mechanismus inhibice	12
2.2.3 Reverzibilní karbamátové inhibitory	13
2.2.4 Organofosfáty	14
2.3 Terapie otravy organofosfáty	20
2.3.1 Anticholinergika	20
2.3.2 Antikonvulziva.....	20
2.3.3 Reaktivátory acetylcholinesterasy	21
3 Syntetická část	23
3.1 Obecná syntetická část.....	23
3.2 Příprava monokvarterní soli.....	24
3.2.1 Monokvarterní sloučeniny – alifatický spojovací řetězec	25
3.2.2 Monokvarterní sloučeniny – xylenový spojovací řetězec.....	28
3.3 Příprava biskvarterních solí	33
3.3.1 Biskvarterní sloučeniny – alifatický spojovací řetězec.....	34
3.3.2 Biskvarterní sloučeniny – xylenový spojovací řetězec.....	37
4 Stanovení reaktivačních parametrů potencio-statickou metodou in vitro	42
4.1 Princip metody	42
4.2 Postup měření	43
4.3 Výsledky měření in vitro	44
5 Diskuze	45
6 Závěr	47
7 Přílohy.....	48
7.1 Lett. Org. Chem. 2006	48
8 Použitá literatura	53

Seznam zkratek

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChI	acetylcholin-jodid
BuChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervový systém
CoA	koenzym A
DFP	diisopropylfluorofosfát
DMF	dimethylformamid
GABA	kyselina γ -aminomáselná
glu	kyselina glutámová
his	histidin
Ch	cholin
LGIC	ligandem řízené iontové kanály
M	muskarinové (receptory)
N	nikotinové (receptory)
NPL	nervově paralytické látky
OF	organofosfát
phe	fenylalanin
ser	serin
trp	tryptofan

1 Úvod

Organofosforové látky (OF) patří mezi uměle vytvořené, vysoce toxické látky [28]. První sloučeniny tohoto typu byly připraveny pro použití v zemědělství jako pesticidy (parathion, chlorpyrifos, metathion, ad.). Dále byly vyvinuty vysoce toxické deriváty, které našly uplatnění ve vojenství – nervově paralytické látky (NPL; sarin, soman, tabun, VX ad.) [32]. Jeden zástupce této skupiny látek (metrifonát) byl schválen ke klinickým studiím při léčbě Alzheimerovy nemoci [1].

OF působí toxicky na nervový systém mechanismem inhibice enzymu acetylcholinesterasy (AChE) [30]. Inhibovaná AChE nemůže plnit svou biologickou funkci – hydrolyzovat acetylcholin uvolněný při synaptickém přenosu. Pokud není činnost AChE obnovena, v organismu dochází k cholinergní krizi a následně smrti v důsledku útlumu dechového centra a paralýzy dýchacích svalů [28].

Reaktivátory AChE jsou používány pro odstranění toxických účinků OF. Tyto sloučeniny (pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, HI-6) jsou schopny štěpit vazbu mezi OF a AChE a jsou kauzální terapií při intoxikacích organofosfáty [28]. Žádný z dosud známých reaktivátorů nemá schopnost uspokojivě reaktivovat všechny typy OF [2]. Také časté intoxikace pracovníků v zemědělství [31] a hrozba intoxikací těmito sloučeninami v souvislosti s rostoucím terorismem vedou k intenzivnímu výzkumu nových potenciálních reaktivátorů AChE.

Cílem této práce je příprava nových biskvarterních reaktivátorů AChE s různými typy spojovacího řetězce mezi pyridiniovými jádry. Poté budou jednotlivé sloučeniny podrobeny *in vitro* testování ke zjištění reaktivačních parametrů. Cílem práce je i literární rešerše celé problematiky se zaměřením na perspektivní sloučeniny.

2 Teoretická část

2.1 Cholinesterasa

Cholinesterasa je základní termín používaný pro rodinu enzymů, které hydrolyzují estery cholinu rychleji než ostatní estery v optimálních podmínkách. Jde o serinové hydrolasy, které patří do rodiny esteras u vyšších eukaryot. Tyto enzymy působí na různé druhy karboxylových esterů [3]. V lidském těle se nacházejí dva typy cholinesterasy s mnoha podtypy a názvy. Jedním z nich je acetylcholinesterasa (AChE, acetylcholin acetyl-hydrolasa, EC 3.1.1.7). Nachází se v erytrocytech, nervových zakončeních, plicích, slezině a všech částech mozku. Jde o membránově vázaný glykoprotein, který existuje v několika molekulových formách. Druhým typem je butyrylcholinesterasa (BuChE, neboli acylcholin acyl-hydrolasa, EC 3.1.1.8), známá také jako sérová nebo nespecifická cholinesterasa. BuChE se nachází převážně v plazmě a má více než jedenáct izoenzymových variant. Je také zastoupena v játrech, hladkém svalstvu, střevech, slinivce a bílé hmotě mozku [4].

2.1.1 Butyrylcholinesterasa

Tento enzym hydrolyzuje butyrylcholin čtyřikrát rychleji než acetylcholin. Na rozdíl od AChE nedokáže hydrolyzovat β -methylacetylcholin. Aktivita BuChE je větší při hydrolyze butyrylcholinu a propionylcholinu, než při hydrolyze acetylcholinu [5]. U lidí je syntetizována v mnoha tkáních, jako jsou játra, plíce, srdce a mozek. Dlouho nebyla funkce tohoto enzymu příliš známa. Nyní se předpokládá, že hraje roli v procesech jako je metabolismus lipoproteinů [6], scavenger toxických molekul [7] a při vzniku amyloidového prekurzorového proteinu [8]. Aktivita BuChE se zvyšuje s věkem a je zvýšena u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Nachází se také v senilních placích [9]. Protože je BuChE také inhibována organofosfáty, snížení její aktivity v plazmě může sloužit k monitorování, zda jedinci nebyli vystaveni OF [10]. Možnost profylaxe exogenní čištěnou lidskou nebo podobnou BuChE je nyní testována jako nový způsob pro profylaxi otravy OF [11].

2.1.2 Acetylcholinesterasa

Acetylcholinesterasa (AChE) je jeden z důležitých enzymů pro nervové funkce a odpovědi. Katalyzuje hydrolyzu esterů s relativní specifitou pro acetylcholin (ACh).

ACh je běžný neurotransmitter centrálního i periferního nervového systému. Je syntetizován v cytoplazmě neuronů z acetyl-CoA (acetyl-koenzym A) a cholinu enzymem cholinacetyltransferasou [26]. Když je uvolněn z axonu, putuje synaptickou štěrbinou k receptoru na druhém konci synapse, aby se na něj navázal. V periferním nervovém systému je ACh využíván na nervosvalové ploténce k řízení svalové kontrakce. Je také využíván v autonomním nervovém systému. Účinky ACh uvnitř buňky jsou zprostředkovány aktivací muskarinových a nikotinových receptorů. AChE ukončuje přenos nervového impulsu rychlou hydrolýzou ACh [12].

2.1.3 Acetylcholinové receptory

Receptory pro ACh mohou být rozděleny na muskarinové (M) a nikotinové (N) subtypy podle afinity k přírodním alkaloidům muskarinu a nikotinu, kteří jsou agonisté ACh [13]. N receptory, které jsou spřaženy s iontovým kanálem, zprostředkovávají rychlou excitační odpověď na ACh. M receptory, které nejsou spřaženy s iontovým kanálem, ale s G-proteinem, zprostředkovávají pomalou excitační i inhibiční odpověď na ACh [14].

2.1.3.1 Nikotinové receptory

Nikotinové receptory jsou prototypem iontového kanálu, jehož aktivita je řízena navázáním ligandu. N receptory zprostředkovávají průchod sodných a draselných iontů přes synaptickou membránu. Existují dva typy N receptorů: muskulární N receptory, které zprostředkovávají přenos signálu mezi buňkami svalů a nervu, a neuronální N receptory, které v mnoha částech nervového systému zprostředkovávají přenos signálu mezi neurony. Tyto receptory se skládají z pěti homogenních podjednotek, poskládané jako homopentamerní nebo pseudopentamerní struktura [14].

Malá molekula ACh se váže na dvě místa v receptoru a vyvolává tím změnu prostorového uspořádání. Ve výsledku se iontový kanál otevře a propouští sodné a draselné ionty přes membránu [15].

2.1.3.1.1 Klasifikace nikotinových receptorů

Muskulární N receptory jsou ligandem řízené iontové kanály (LGIC), složené z pěti podjednotek: dvou α_1 , a jedné β_1 , δ , γ a případně ϵ (závislé na stádiu vývoje) [15].

Neuronální N receptory jsou také LGIC, složené z α a β podjednotek se speciálními strukturálními a farmakologickými vlastnostmi. Účastní se fyziologických účinků ACh a jsou spojeny s mnoha neurotransmitterovými systémy. Jejich exprese se mění během vývoje a stárnutí, stejně jako během onemocnění jako jsou autismus, schizofrenie, Alzheimerova a Parkinsonova choroba a demence s Lewyho tělísky [16]. Nikotinové receptory obsahují dvě dobře rozlišitelné domény pro vazbu ligandu, což vede k různým cholinergním účinkům. V hydrofilní extracelulární části obou α podjednotek se nachází vazebné místo pro agonistu, jako je ACh, a kompetitivního antagonistu, jako je např. tubokurarin. Mezi hlavní části vazebného místa patří několik aromatických zbytků, které jsou doplněné o cysteinový pár v pozici 192-193 [17].

2.1.3.2 Muskarinové receptory

M receptory byly poprvé definovány na podkladě selektivního agonismu muskarinu a antagonismu atropinu [18]. Nacházejí se v neuronech centrálního i periferního nervového systému, srdeční a hladké svaloviny a různých endokrinních žláz [19]. Existuje pět subtypů (M1-M5) receptorů specifických pro různé tkáně [20]. Na periférii M receptory zprostředkovávají signály pro kontrakce hladkého svalstva, sekreci endokrinních žláz, a změnu síly srdečního stahu a frekvence. V CNS přenášejí signál pro řízení motoriky, regulaci tělesné teploty, regulaci kardiovaskulárního systému a paměť. Strukturně jsou M receptory glykoproteiny se sedmi transmembránovými doménami, podobné receptorům, které jsou spřaženy s G-proteinem [21].

2.1.4 Vlastnosti acetylcholinesterasy

2.1.4.1 Struktura molekuly

Monomer AChE je elipsoidní molekula s molekulovou hmotností okolo 60 000. Skládá se z 12 β -skládaných listů a 14 α -helixů [22]. Výzkum našel několik hlavních domén v molekule proteinu: katalytické aktivní místo složené ze dvou podjednotek, aromatickou šterbinu, kde aktivní místo leží, a vnější anionické místo, odlišné od aktivního místa, které hraje roli v upevnění substrátu uvnitř aromatické šterbiny a aktivního místa [22].

2.1.4.2 Aktivní místo

Aktivní místo AChE je složeno ze dvou podjednotek. Esteratická podjednotka, která obsahuje katalytickou triádu a anionickou podčást, se váže ke kladné kvarterní oblasti acetylcholinu. Esteratická podjednotka a s ní katalytická triáda zahrnuje aminokyseliny Ser200, His440 a Glu327. Tato triáda je podobná jiným serinovým proteasám. Anionická podjednotka je složena z Trp84, Phe330 a Phe331. Její funkcí je měnit orientaci nabitě části substrátu, která vstupuje do aktivního centra. Tato funkce je dána zbytkem Trp84 [22]. Podrobnější studie trojrozměrné struktury AChE umisťují aktivní místo ke dnu úzké a zdánlivě nepřístupné prohlubně asi 20 Å uvnitř enzymu [23]. Vysoký stupeň aromaticity v okolí aktivního místa vysvětluje, proč studie ukazují, že hydrofobní a anionické vazebné místo je nezávislé na aktivním místě. Pouze málo zbytků aminokyselin je přímo uvnitř enzymové prohlubně [24].

2.1.4.3 Hydrolýza acetylcholinu

Při hydrolýze je elektrofilní karbonylový uhlík ACh nukleofilně atakován hydroxylovou skupinou serinu v aktivním místě enzymu a vytváří se dočasně vazba mezi enzymem a substrátem. Imidazolový dusík histidinu pak může vytvořit vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou serinu a tím podpořit nukleofilní reakci. Imidazolová skupina tedy může usnadnit přenos acylové skupiny z hydroxyly serinu na molekulu vody. Poté následuje rychlá hydrolýza acetylovaného enzymu za uvolnění molekuly kyseliny octové a obnovení aktivního místa [25]. Cholin je poté zpětně vychytáván do nervového zakončení k dalšímu využití [26].

2.1.4.4 Substrátová inhibice

Existují různá vysvětlení, proč AChE a BuChE různě reagují na nadbytečná množství ACh. Předpokládá se, že je AChE allostericky regulována vazbou acetylcholinu na tzv. periferní vazebné místo během konformačních změn aktivního místa. Jde tedy o inhibici substrátem. Není ale známo, zda má tato inhibice nějakou biologickou funkci nebo jde pouze o následek molekulárních a strukturních změn při práci enzymu [27].

2.2 Inhibice acetylcholinesterasy

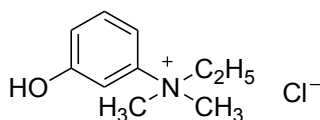
Inhibitory AChE působí jako nepřímá parasymptomimetika. Dochází ke zvýšení koncentrace ACh na efektoch parasymptatiku (M-receptory), ve vegetativních gangliích (neuronální N-receptory) a na nervosvalové ploténce (muskulární N-receptory). Inhibitory AChE proto působí neselektivně, mají účinky nejen parasymptomimetické, ale i cholinomimetické [26].

2.2.1 Rozdělení inhibitorů acetylcholinesterasy

Jednotlivé inhibitory se liší chemickou strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Na nich závisí schopnost látek pronikat biologickými membránami, tedy do CNS a působit centrálně. Podle účinku se dělí na krátkodobé (reverzibilní), které účinkují pouze několik málo minut až hodin (karbamáty), a dlouhodobé (ireverzibilní), které účinkují stovky hodin nebo až do syntézy enzymu *de novo* (organofosfáty).

Podle chemické struktury lze inhibitory rozdělit na:

- jednoduché primární alkoholy s kvarterním dusíkem - př. edrofonium-chlorid (obr. 1)
- karbamáty, estery kyseliny karbamové s alkoholem, obsahující terciární či kvarterní dusík - př. fysostigmin (obr. 2.1), neostigmin (obr. 2.2)
- organofosfáty, tedy organické sloučeniny kyseliny fosforečné či fosfonové - př. paraoxon (obr. 7.2), parathion (obr. 7.1) [26].



Obrázek 1 Edrofonium-chlorid

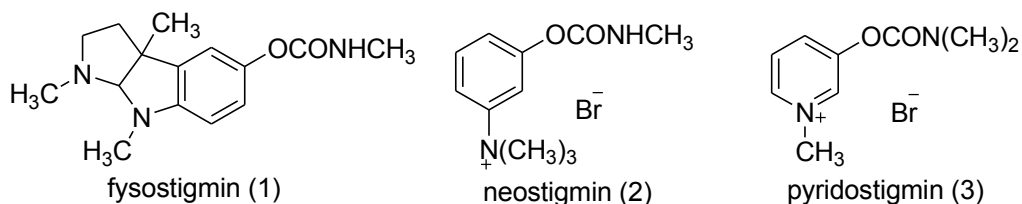
2.2.2 Mechanismus inhibice

Inhibice může probíhat jak na anionickém místě, tak i v aktivním centru. Princip účinku je podobný, rozdíly mezi působením jednotlivých inhibitorů odrážejí povahu reakce inhibitoru s AChE a tedy rozdílnou rychlost uvolňování (deacylace) enzymu. S výjimkou edrofontia se inhibitory vážou na enzym kovalentní vazbou. Edrofonium obsahuje kvarterní dusík a váže se pouze na aniontové místo enzymu. Vzniklá iontová vazba je reverzibilní a účinek je velmi krátký (2-10 minut). Karbamáty jsou také

podobně jako ACh substráty AChE. Také u nich dochází ke dvoustupňové hydrolyze. Enzym inhibovaný karbamátem je však mnohem odolnější k hydrolyze a v závislosti na použité látce trvá inhibice 30 minut až 6 hodin. Organofosfáty reagují pouze s aktivním, esteratickým místem enzymu. Kovalentní vazba s hydroxylovou skupinou serinu je mimořádně stabilní a hydrolyzuje velmi pomalu (stovky hodin), nebo nehydrolyzuje vůbec. Inhibice je proto ireverzibilní [26].

2.2.3 Reverzibilní karbamátové inhibitory

Jde o sloučeniny, které se svou strukturou podobají acetylcholinu. Jsou to estery odvozené od kyseliny karbamové s kvarterním či terciárním atomem dusíku [26]. Příklady některých struktur karbamátů ukazuje obrázek 2.

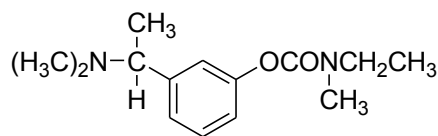


Obrázek 2 Vybrané karbamátové inhibitory acetylcholinesterasy.

2.2.3.1 Účinky a využití reverzibilních inhibitorů

Účinky reverzibilních inhibitorů AChE jsou podobné účinkům přímých parasymptomimetik. Manifestují se především M-účinky v kardiovaskulárním, zažívacím a urogenitálním systému, na oku a žlázách. U srdce dochází ke snížení srdečního výdeje, srdeční frekvence a krevní tlak se mění jen mírně. V terapeutických dávkách karbamáty zesilují a prodlužují působení endogenního ACh na nervosvalové ploténce, což se projevuje zvýšením síly stahu. Látky s kvarterním dusíkem (neostigminium-bromid, obr. 2.2) mají zesílený účinek na nervosvalovém spojení. Látky s terciárním dusíkem pronikají hematoencefalickou bariérou a mají centrální účinek (fysostigmin, obr. 2.1).

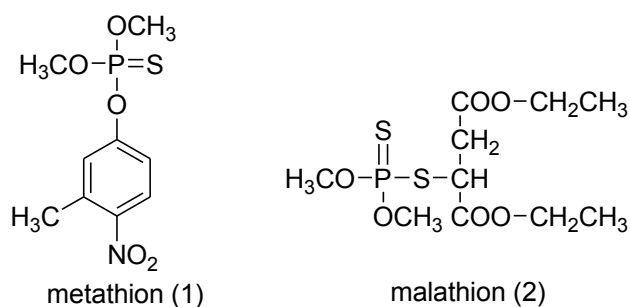
Terapeuticky se používají k léčbě pooperačních atonií trávicího ústrojí a močových cest, ke snížení nitroočního tlaku u glaukomu, jako antidota periferních myorelaxancií, k léčbě myasthenia gravis a v neposlední řadě k symptomatické léčbě Alzheimerovy choroby (rivastigmin, obr. 3) [26].



Obrázek 3 Rivastigmin

2.2.4 Organofosfáty

Některé organické sloučeniny fosforu se řadí mezi nervově paralytické látky, vyznačující se vysokou toxicitou vůči savcům. Jsou významnou a nebezpečnou skupinou bojových chemických látek. Vyznačují se rychlým nástupem účinku a průnikem do organismu všemi branami vstupu. Jejich syntéza je snadná a levná a jsou snadno použitelné. Sloučeniny stejné základní struktury se používají v průmyslu jako změkčovadla, hydraulické kapaliny, pro nehořlavé úpravy atd. Ve veterinární i humánní medicíně našly uplatnění jako léčiva či jako sloučeniny k výzkumu nervových funkcí. Rozsáhlého použití dosáhly tyto sloučeniny v zemědělství jako insekticidy. Tyto sloučeniny jsou běžně dostupné (př. metathion (obr. 4.1), malathion (obr. 4.2)) [28].

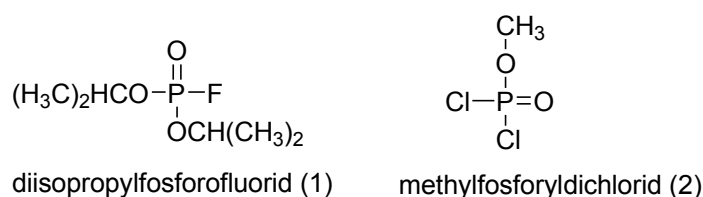


Obrázek 4 Vybrané příklady insekticidů

2.2.4.1 Historie organofosfátů

První syntéza organofosforové sloučeniny byla provedena v polovině 19. století v laboratoři profesora Wurze v Paříži. Prvním vědcem, který připravil sloučeninu s přímou vazbou fosforu na uhlík (methylfosforyldichlorid, obr. 5.2) byl v roce 1873 von Hoffmann. Ve dvacátém století Lange a von Crueger připravili mnoho dialkylfosfonofluoridů s insekticidními a fungicidními vlastnostmi. V období 1934 až 1944 Schraderův tým objevil okolo dvou tisíc OF a v roce 1944 byly připraveny dva dobře známé insekticidy: diethyl-*p*-nitrofenylfosfát (paraoxon, obr. 7.2) a diethyl-*p*-nitrofenylthiofosfát (parathion, Obr 7.1). Na počátku roku 1935 přiměla německá nacistická vláda Schradera k práci na organofosforových chemických zbraních jako

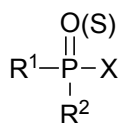
tabun, soman a sarin. V sérii esterů obsahující fluor, kromě sarinu a somanu, Schrader vyvinul diisopropylfosforofluorid (DFP, obr. 5.1). Později byly popsány toxické a farmakologické účinky DFP a staly se modelovými strukturami ke studiu mechanismů cholinergního přenosu signálu v nervovém systému. Dalším OF byl VX (obr. 8.4), který byl vyvinut v roce 1957 Tammelinem [29]. Dnes se OF využívají v zemědělství jako pesticidy (chlorpyrifos, obr. 7.3), sloučeniny využívané v průmyslu a jako léčiva [30]. Časté jsou také intoxikace pracovníků v zemědělství, kteří jsou v přímém kontaktu s těmito jedy [31]. Hrozba intoxikací těmito látkami stoupá i v souvislosti s teroristickými útoky.



Obrázek 5 Příklady některých organofosfátů

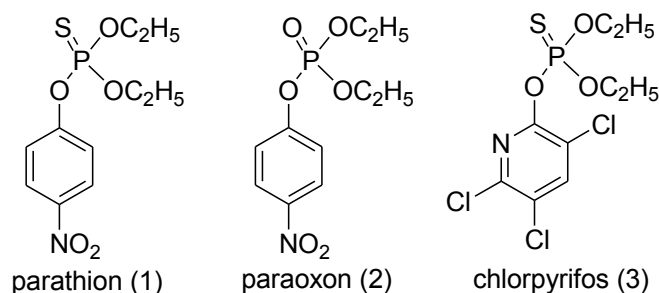
2.2.4.2 Struktura a rozdělení organofosfátů

Chemická struktura OF je odvozena od kyseliny fosforečné, fosfonové nebo jejich thio-analogů, které vykazují menší toxicitu [32]. Chemickou strukturu vystihuje obecný Schraderův vzorec pro organofosforové sloučeniny (obrázek 6). Zbytky R^1 a R^2 jsou nejčastěji vodík, alkyl (popř. cykloalkyl), aryl, alkoxy, alkylthio a amino skupiny. X je většinou odstupující skupina jako halogen, kyano, alkylthio skupina nebo zbytek organické či anorganické kyseliny [32].



Obrázek 6 Schraderův vzorec

Chemické struktury některých pesticidů a insekticidů uvádí obrázek 7.

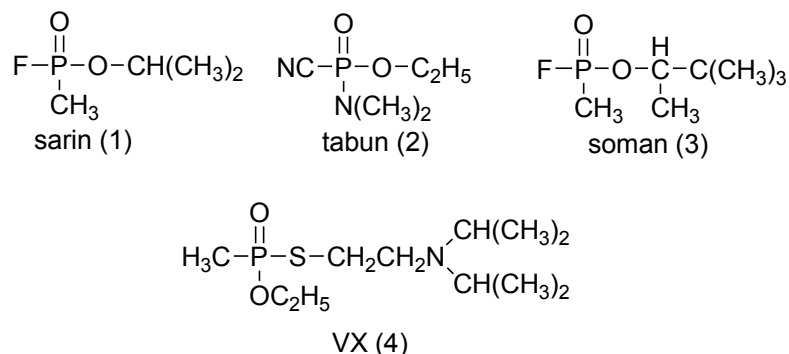


Obrázek 7: Příklady některých pesticidů

NPL se dělí na dvě velké skupiny podle fyzikálně-chemických vlastností:

- G-látky: tabun (GA, *O*-ethyl dimethylamidokyanofosfát, obr. 8.2), sarin (GB, *O*-isopropylmethylfluorofosfonát, obr. 8.1), soman (GD, *O*-pinakolylmethylfluorofosfonát, obr. 8.3).
- V-látky: VX (*O*-ethyl-*S*-(2-diisopropylaminoethyl)-methylthiofosfonát, obr. 8.4) a jeho analog VR (*O*-isobutyl-*S*-(2-diethylaminoethyl)-methylthiofosfonát) [28].

Příklady některých NPL uvádí obrázek 8.



Obrázek 8: Příklady některých nervově paralytických látek

2.2.4.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti nervově paralytických látek

G-látky jsou bezbarvé, pohyblivé kapaliny podobné vodě bez výraznějšího zápachu. Jsou relativně dobře rozpustné ve vodě a dobře v organických rozpouštědlech. Je pro ně charakteristická vysoká těkavost, proto nejpravděpodobnější branou vstupu do organismu jsou dýchací cesty. Ve vnějším prostředí vydrží bez ztráty toxicity 12-24 hodin.

V-látky jsou v čistém stavu bezbarvé, viskózní kapaliny bez výraznějšího zápachu. Je pro ně charakteristická velmi nízká těkavost, takže vydrží ve vnějším prostředí a ve vodě velmi dlouhou dobu (týdny až měsíce). Ve vodě jsou velmi špatně

rozpuštěné, zatímco v organických rozpouštědlech a tucích se rozpouštějí velmi dobře [28].

2.2.4.4 Mechanismus účinku

Základním mechanismem účinku OF je zásah do cholinergního nervového systému cestou inhibice AChE. Enzym tvoří s organofosfátem přechodný komplex vazbou na hydroxyl serinu v aktivním místě enzymu s disociační konstantou K_D . Následně dochází k odštěpení části molekuly OF (odstupující skupina X) a výsledkem je fosforylovaný enzym. Ten je více méně stabilní a rychlost jeho defosforylace je velmi pomalá. Poločas rozpadu fosforylované AChE je v rozmezí několika hodin až několika dní. Tato inhibice AChE je ireverzibilní a spontánní defosforylace probíhá pomaleji než syntéza enzymu *de novo* [33]. Celý proces shrnuje schéma 1.

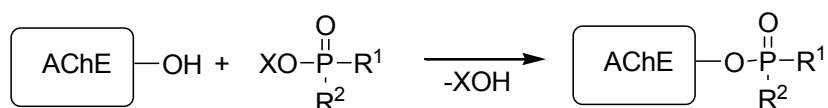


Schéma 1: Inhibice acetylcholinesterasy

2.2.4.5 Spontánní regenerace a stárnutí

Spontánní znovuoobnovení aktivity inhibovaného enzymu, stejně jako syntéza AChE *de novo*, probíhá velmi pomalu. Fosforylovaný enzym může projít spontánní hydrolýzou za uvolnění volného enzymu. Jde o chemickou reakci, která je závislá na teplotě, pH, iontové síle a typu inhibitoru [34].

Stárnutí enzymu (dealkylace) je chemická reakce, při které je inhibovaná AChE změněna do tzv. nereaktivovatelné formy (viz kap. 2.3.3). Rychlost dealkylace závisí na délce kontaktu enzymu s OF a na chemické struktuře inhibitoru. Z NPL nejrychleji dealkyluje AChE inhibovaná somanem (minuty), zatímco nejpomalejší dealkylací je charakterizován účinek látky VX (dny). Tento fakt významně ovlivňuje efekt léčby intoxikací těmito sloučeninami [28]. Ekström a kol. popsali tento proces jako změnu vodíkových vazeb v aktivním místě inhibované AChE, obzvláště vazeb His447. Přístup k aktivnímu místu je omezen z důvodu změny konformace Pro338 a následně je fosforamidoylová skupina (např. tabunu) nahrazena molekulou vody a zbytek molekuly inhibitoru se koordinuje uvnitř enzymu. Zbytek komplexu AChE-OF je po těchto změnách nereaktivovatelný [35]. Oba tyto procesy popisuje schéma 2.

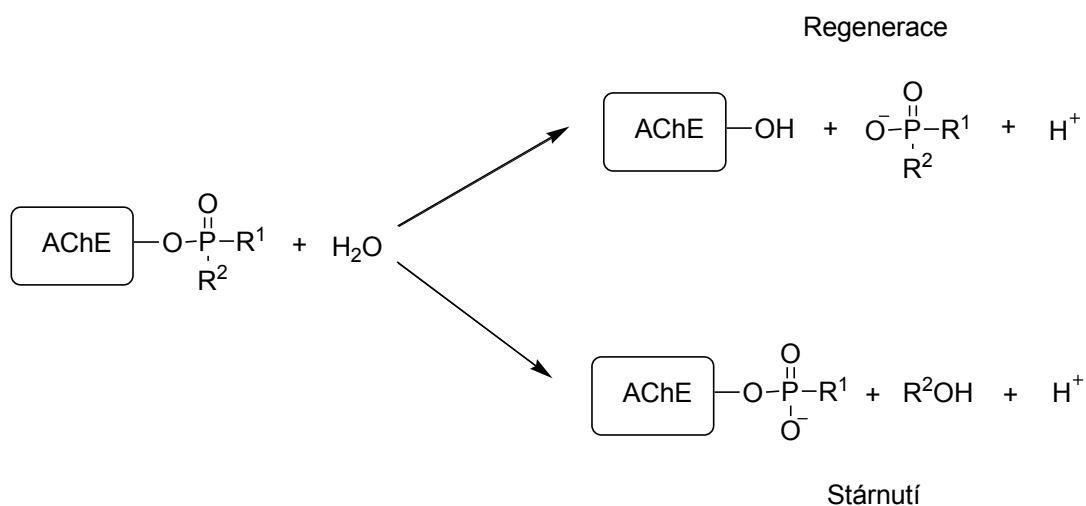


Schéma 2: Spontánní regenerace a stárnutí AChE

2.2.4.6 Klinický obraz otravy organofosfáty

Inhibice AChE vede k narušení cholinergního přenosu nervového vzruchu, cestou nahromadění acetylcholinu na receptorech, s jejich následným dlouhodobým drážděním. Klinickým důsledkem, v závislosti na jejich lokalizaci a typu, jsou muskarinové, nikotinové a centrální příznaky, které jsou charakteristické pro akutní fázi intoxikace. Souboru těchto příznaků se říká akutní cholinergní krize [28].

2.2.4.6.1 Akutní fáze

Mezi muskarinové příznaky patří zvýšení sekrece tekutin (bronchorrhea, zvýšená salivace, slzení a pocení), bronchokonstrikce (tíže na prsou a dušnost), bradykardie, zvracení a zvýšení gastrointestinální motility (nevolnost, křeče a defekace). OF také způsobují miózu oka a poruchu akomodace (vliv na ciliární sval).

Nikotinové příznaky jsou způsobené zvýšenou koncentrací ACh na nervosvalové ploténce a ve vegetativních gangliích. Dochází ke svalové ochablosti a svalovým záškubům přecházejícím v tonicko-klonické křeče, které mohou vyústit až v paralýzu kosterního svalstva (tzn. i paralýzu dýchacích svalů).

V CNS vede inhibice AChE k centrálním příznakům. Mezi ně patří bolest hlavy, nespavost, závratě, zmatenost, letargie, v některých případech nezřetelná mluva, křeče, kóma a deprese dechového centra [36].

2.2.4.6.2 *Přechodný syndrom*

Po akutní fázi (1. až 4. den) se objevuje tzv. přechodný syndrom. Je charakterizován svalovou slabostí a obrnou hlavových nervů. Těžkosti při dýchání se mohou rozvinout v respirační selhání, doprovázené obrnou bránice a dýchacích svalů. Plné uzdravení nastává po 4-21 dnech při intenzivní péči s umělou plicní ventilací. Přestože je přesná patogeneze přechodného syndromu neznámá, jde pravděpodobně o pozměněnou funkci a aktivitu N receptorů [37].

2.2.4.6.3 *Organofosfáty navozená opožděná polyneuropatie*

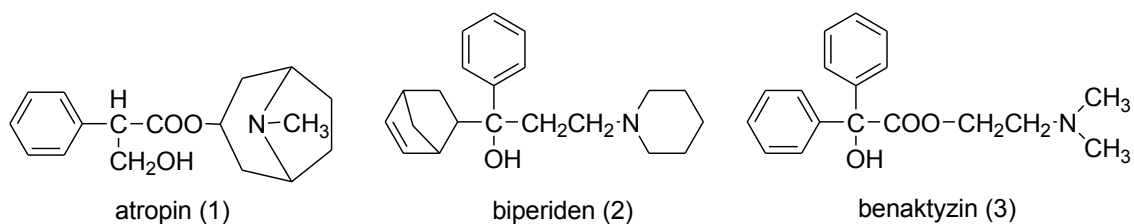
Tento syndrom se objevuje 7.-21. den po otravě a převážně ovlivňuje dlouhé nervy periferního nervového systému. Způsobuje symetrickou slabost periferních svalů rukou a nohou, s různým stupněm poruchy senzorických funkcí. Tato dysfunkce může být trvalá, ale je možná i následná částečná reparace. Předpokládá se, že v patogenezi tohoto syndromu hraje roli fosforylace a následná dealkylace tzv. neurotoxické esterasy, která je součástí nervové tkáně [38].

2.3 Terapie otravy organofosfáty

Existují tři strategie léčby otravy OF: použití anticholinergních léčiv (př. atropin), sloučenin reaktivujících acetylcholinesterasu (oximy) a antikonvulzivní terapie (benzodiazepinová antikonvulziva) [29].

2.3.1 Anticholinergika

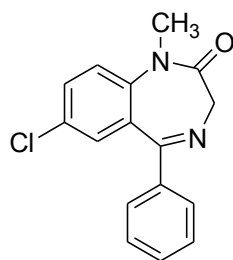
Anticholinergika (atropin, obr. 9.1) zabraňují nadměrné stimulaci cholinergních receptorů tak, že znemožňují navázání uvolněného ACh na tyto receptory. Patří s antikonvulzivy mezi funkční antidota (symptomatická), protože neodstraňují příčinu otravy, ale zmírňují její následky. Atropin se při otravě podává do prvních příznaků atropinizace (mydriáza, zčervenání kůže, suchost sliznic, tachykardie). U těžších otrav lze použít benaktyzin (obr. 9.3), pro nějž je charakteristický centrální antimuskarinový účinek. Na základě experimentálních výsledků lze použít ještě další látky, jako je biperiden (obr. 9.2) [28].



Obrázek 9 Příklady některých anticholinergik

2.3.2 Antikonvulziva

Nejdůležitějším antikonvulzivem, používaným při otravě OF, je diazepam (obr. 10) [39]. Diazepam potencuje účinek inhibičního neurotransmiteru kyseliny γ -aminomáselné (GABA) na jejích receptorech [40]. Hlavním účinkem benzodiazepinů v CNS je hyperpolarizace neuronů, které jsou pak méně citlivé k acetylcholinem navozené depolarizaci. Konečným důsledkem je zastavení propagace křečí [41]. Diazepam u OF otrav snižuje úzkost, neklid a svalové záškuby, zastavuje křeče a snižuje mortalitu ve spojení s terapií atropinem a oximy. Diazepam by měl být podán pacientům, u kterých se objevují křeče nebo svalové záškuby. V některých případech by měl být podán i k předcházení těchto stavů [42].



diazepam

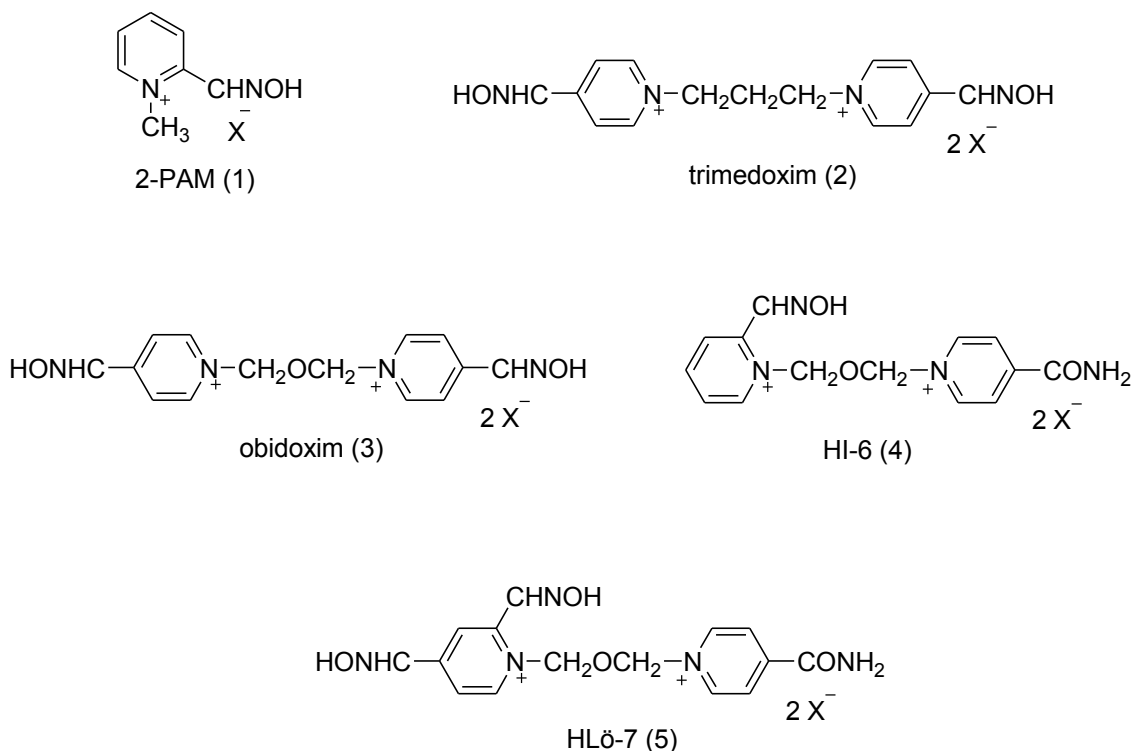
Obrázek 10 Příklad antikonvulziva

2.3.3 Reaktivátory acetylcholinesterasy

Reaktivátory AChE umožňují návrat k normálnímu přenosu cholinergního nervového vzruchu cestou reaktivace inhibované AChE. Patří tedy mezi kauzální antidota [28].

2.3.3.1 Historie a přehled

První sloučeninou, která byla schopná rušit fosforylaci AChE, byl hydroxylamin (objeveno v roce 1951). Dokázal odstranit fosforylaci AChE způsobenou tetraethylpyrofosfátem [43]. V dalších letech se výzkum specifických antidot OF zaměřuje na hledání sloučenin, které dokážou nukleofilně atakovat fosforylovanou AChE a mají podobnou strukturu jako ACh. Prvním pyridiniovým oximem byl pralidoxim (2-PAM; obr. 11.1), který dokáže reaktivovat AChE mnohem rychleji než hydroxylamin. Poprvé byl použit v roce 1956 při otravě parathionem v Japonsku [44]. Další vývoj v této oblasti byl zaměřen na bispyridiniové sloučeniny, jako jsou trimedoxim (TMB-4, obr. 11.2), obidoxim (LüH-6, obr. 11.3), HI-6 (obr. 11.4) a HLö-7 (obr. 11.5). Reaktivátory AChE jsou tedy mono nebo bispyridiniové sloučeniny s jednou nebo více oximovými skupinami. Používají se různé soli, jako např. chloridy, jodidy, bromidy, laktáty a methylsulfonáty [29]. V armádě ČR se používají reaktivátory pod firmními názvy Renol (methoxim), Chonol I (obidoxim+atropin) a Antiva (HI-6) [28].



Obrázek 11 Příklady některých reaktivátorů acetylcholinesterasy

2.3.3.2 Mechanismus účinku

Hlavním mechanismem účinku reaktivátorů AChE je odštěpení zbytku OF na hydroxylové skupině serinu v aktivním místě AChE [45]. Kladně nabitá část reaktivátoru je orientována k aktivnímu místu. Oximová skupina potom nukleofilně napadá fosforylovanou část enzymu. Vzniká přechodný komplex reaktivátor-fosforylovaný enzym, který se následně rozpadá za odstoupení regenerovaného enzymu. Fosforylovaný oxim, vzniklý během reaktivity, se může stát silným inhibítoem a reinhibovat regenerovaný enzym [46]. Reinhibice AChE může probíhat, jen pokud fosforylovaný oxim inhibuje AChE rychleji, nežli dochází k eliminaci nebo rozkladu v netoxické produkty [47]. Mechanismus reaktivity zjednodušeně popisuje schéma 3.

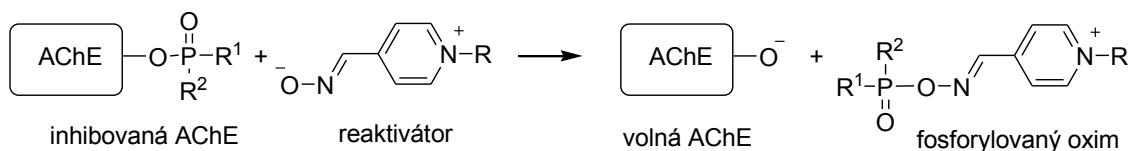


Schéma 3 Mechanismus reaktivity

3 Syntetická část

3.1 Obecná syntetická část

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

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

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

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

3.2 Příprava monokvarterní soli

4-hydroxyiminomethylpyridin (45.0 g; 32.8 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (30 ml) a byl přidán 1,4-dibrombutan (19.32 ml; 163.8 mmol). Směs byla zahřívána k varu acetonu pod zpětným chladičem po dobu 9 hodin a poté ochlazená na laboratorní teplotu. Surový produkt byl odfiltrován za sníženého tlaku a rekrystalován v MeCN (schéma 4).

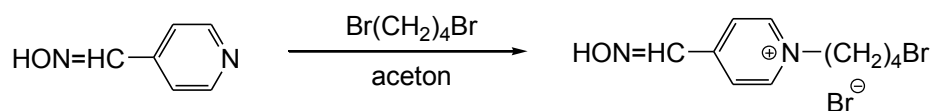
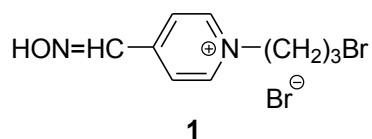


Schéma 4 Příprava 1-(4-brombutyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromidu.

3.2.1 Monokvarterní sloučeniny – alifatický spojovací řetězec

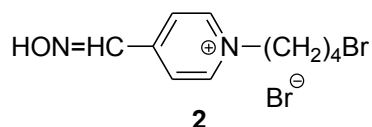
(1)

1-(3-brompropyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Výtěžek 72 %. TLC R_f 0.5, T.t. 184-186 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6) se shodují s daty z literatury. ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.45, 145.19, 145.04, 124.02, 58.91, 32.98, 30.15. EA: vypočítáno 33.36 % C, 3.73 % H, 8.65 % N; nalezeno 33.26 % C, 3.84 % H, 8.80 % N. ESI-MS: m/z 243.1 $[\text{M}]^+$ (vypočítáno $[\text{C}_9\text{H}_{12}\text{BrN}_2\text{O}]^+$ 243.01).



(2)

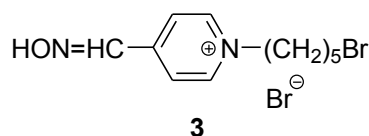
1-(4-brombutyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Výtěžek 70 %. TLC R_f 0.6, T.t. 146-149°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.08 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2,6), 8.44 (s, 1H, -CH=NOH), 8.25 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-3,4), 4.64 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, N- CH_2 -), 3.57 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, Br- CH_2 -), 2.11-1.96 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2 -), 1.89-1.76 2.11-1.96 (m, 2H, Br- CH_2 - CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.33, 145.05, 124.07, 59.25, 33.98, 29.34, 28.58. EA: vypočítáno 35.51 % C, 4.33 % H, 8.43 % N; nalezeno 35.53 % C, 4.17 % H, 8.29 % N. ESI-MS: m/z 256.9 $[\text{M}]^+$ (vypočítáno $[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}]^+$ 257.03).



(3)

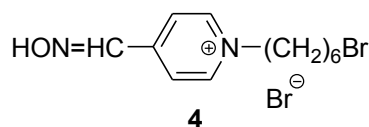
1-(4-brompentyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Výtěžek 73 %. TLC R_f 0.6, T.t. 178-180°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.10 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-2,6), 8.44 (s, 1H, -CH=NOH), 8.25 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3,4), 4.61 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, N- CH_2 -), 3.54 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, Br- CH_2 -), 2.00-1.78 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -, Br- CH_2 - CH_2 -), 1.47-1.33 (m, 2H, N-(CH_2) $_2$ - CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.25, 145.03, 123.97, 59.83, 34.75, 31.35, 29.56, 23.87. EA: vypočítáno

37.53 % C, 4.58 % H, 7.96 % N; nalezeno 37.36 % C, 4.66 % H, 7.87 % N. ESI-MS: m/z 271.0 [M]⁺ (vypočítáno [C₁₁H₁₆BrN₂O]⁺ 271.04).



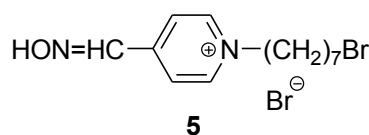
(4)

1-(4-bromohexyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Výtěžek 50 %. TLC R_f 0.6, T.t. 159-162°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.10 (d, 2H, J = 6.0 Hz, H-2,6), 8.44 (s, 1H, -CH=NOH), 8.24 (d, 2H, J = 6.0 Hz, H-3,4), 4.59 (t, 2H, J = 7.2 Hz, N-CH₂-), 3.52 (t, 2H, J = 6.7 Hz, Br-CH₂-), 1.98-1.72 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-, Br-CH₂-CH₂-), 1.47-1.23 (m, 4H, N-(CH₂)₂-(CH₂)₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 148.21, 145.02, 123.95, 60.04 34.97, 31.79, 30.32, 26.80, 24.39. EA: vypočítáno 39.37 % C, 4.96 % H, 7.65 % N; nalezeno 39.37 % C, 5.09 % H, 7.70 % N. ESI-MS: m/z 285.0 [M]⁺ (vypočítáno [C₁₂H₁₈BrN₂O]⁺ 285.06).



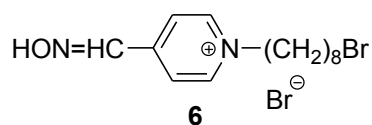
(5)

1-(4-bromheptyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Výtěžek 28 %. TLC R_f 0.7, T.t. 175-177°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.08 (d, 2H, J = 6.0 Hz, H-2,6), 8.44 (s, 1H, -CH=NOH), 8.24 (d, 2H, J = 6.0 Hz, H-3,4), 4.58 (t, 2H, J = 7.2 Hz, N-CH₂-), 3.52 (t, 2H, J = 6.7 Hz, Br-CH₂-), 1.96-1.72 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-, Br-CH₂-CH₂-), 1.43-1.21 (m, 6H, N-(CH₂)₂-(CH₂)₃-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 148.22, 145.04, 123.97, 60.11, 35.10, 31.97, 30.43, 27.37, 27.18, 25.12. EA: vypočítáno 41.08 % C, 5.30 % H, 7.37 % N; nalezeno 41.22 % C, 5.45 % H, 7.43 % N. ESI-MS: m/z 299.0 [M]⁺ (vypočítáno [C₁₃H₂₀BrN₂O]⁺ 299.08).



(6)

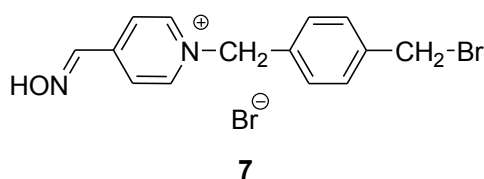
1-(4-bromoktyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Výtěžek 39 %. TLC R_f 0.7, T.t. 140-142°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.09 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-2,6), 8.44 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 8.24 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3,4), 4.58 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, N- CH_2 -), 3.51 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, Br- CH_2 -), 1.96-1.71 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -, Br- CH_2 - CH_2 -), 1.41-1.19 (m, 8H, N-(CH_2) $_2$ -(CH_2) $_4$ -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.21, 145.02, 123.96, 60.12, 35.16, 32.05, 30.47, 28.12, 27.73, 27.28, 25.17. EA: vypočítáno 42.66 % C, 5.63 % H, 7.11 % N; nalezeno 42.83 % C, 5.76 % H, 7.19 % N. ESI-MS: m/z 313.0 $[\text{M}]^+$ (vypočítáno $[\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{BrN}_2\text{O}]^+$ 313.09).



3.2.2 Monokvarterní sloučeniny – xilenový spojovací řetězec

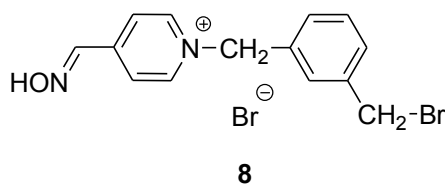
(7)

1-(4-brommethylbenzyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Reakční směs byla míchána 12 h při teplotě varu acetonu pod zpětným chladičem. TLC R_f 0.60, Výtěžek 97 %. T.t. 198-201 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.18 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, PyrH), 8.43 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 8.26 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, PyrH), 7.52 (d, 4H, $J = 1.4$ Hz, ArH), 5.86 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.71 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.73, 145.03, 145.00, 139.16, 134.24, 129.98, 129.04, 124.36, 62.20, 33.54. EA: vypočítáno 43.55 % C, 3.65 % H, 7.26 % N; nalezeno 43.61 % C, 3.94 % H, 7.27 % N. ESI-MS: m/z 305.0 [M^+] (vypočítáno [$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}^+$] 305.03).



(8)

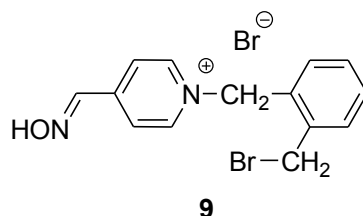
1-(3-brommethylbenzyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Reakční směs byla míchána 6h při teplotě varu acetonu pod zpětným chladičem. Výtěžek 98 %. TLC R_f 0.60, T.t. 157-158 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.18 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, PyrH), 8.43 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 8.27 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, PyrH), 7.61 (s, 1H, ArH), 7.53-7.38 (m, 3H, ArH), 5.87 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.69 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.75, 145.03, 139.04, 134.73, 130.13, 129.55, 129.32, 128.60, 124.38, 62.24, 33.63. EA: vypočítáno 43.55 % C, 3.65 % H, 7.26 % N; nalezeno 43.57 % C, 3.91 % H, 7.31 % N. ESI-MS: m/z 305.0 [M^+] (vypočítáno [$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}^+$] 305.03).



(9)

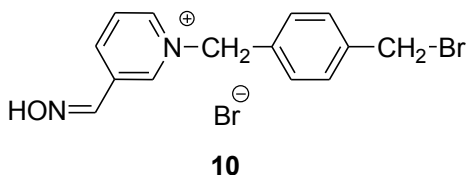
1-(2-brommethylbenzyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Reakční směs byla míchána 2h při teplotě varu acetonu pod zpětným chladičem. Výtěžek 98 %. TLC R_f 0.60, T.t. 204-206 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.06 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, PyrH), 8.46 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 8.28 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, PyrH), 7.60 (d, 1H, $J = 6.6$ Hz, ArH), 7.53-7.38 (m, 2H, ArH), 7.31 (d, 1H, $J = 6.6$ Hz, ArH), 6.06 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

), 4.95 (s, 2H, -CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 148.87, 145.33, 145.06, 137.07, 132.26, 131.55, 130.34, 129.95, 129.64, 124.23, 59.55, 31.68. EA: vypočítáno 43.55 % C, 3.65 % H, 7.26 % N; nalezeno 43.46 % C, 4.01 % H, 7.25 % N. ESI-MS: m/z 305.0 [M⁺] (vypočítáno [C₁₄H₁₄BrN₂O⁺] 305.03).



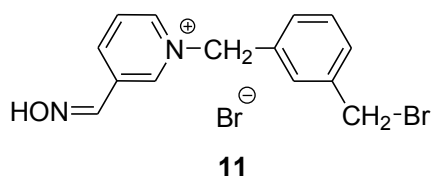
(10)

1-(4-bromomethylbenzyl)-3-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Reakční směs byla míchána 4,5h při teplotě varu acetonu pod zpětným chladičem. Výtěžek 92 %. TLC R_f 0.60, T.t.189-190 °C. ¹H NMR s (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.44 (s, 1H, PyrH), 9.21 (d, 1H, J = 8.0 Hz, PyrH), 8.75 (d, 1H, J = 8.0 Hz, PyrH), 8.37 (s, 1H, -CH=NOH), 8.24-8.14 (m, 1H, PyrH), 7.61-7.48 (m, 4H, ArH), 5.93 (s, 2H, -CH₂-), 4.71 (s, 2H, -CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 144.42, 143.24, 142.33, 141.96, 139.24, 133.99, 133.74, 129.98, 129.18, 128.49, 62.92, 33.54. EA: vypočítáno 43.55 % C, 3.65 % H, 7.26 % N; nalezeno 43.53 % C, 3.95 % H, 7.25 % N. ESI-MS: m/z 305.0 [M⁺] (vypočítáno [C₁₄H₁₄BrN₂O⁺] 305.03).



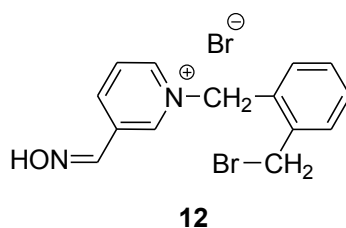
(11)

1-(3-bromomethylbenzyl)-3-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Reakční směs byla míchána 7h při teplotě varu acetonu pod zpětným chladičem. Výtěžek 89 %. TLC R_f 0.60, T.t. 210-211 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.45 (s, 1H, PyrH), 9.22 (d, 1H, J = 6.0 Hz, PyrH), 8.75 (d, 1H, J = 8.0 Hz, PyrH), 8.38 (s, 1H, -CH=NOH), 8.20 (dd, 1H, J = 6.5 Hz), 7.59-7.31 (m, 4H, ArH), 5.93 (s, 2H, -CH₂-), 4.49 (s, 2H, -CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 144.38, 143.68, 143.28, 142.24, 141.99, 133.80, 133.70, 128.95, 128.50, 127.38, 127.23, 126.73, 63.44, 62.35. EA: vypočítáno 43.55 % C, 3.65 % H, 7.26 % N; nalezeno 43.61 % C, 3.99 % H, 7.27 % N. ESI-MS: m/z 305.0 [M⁺] (vypočítáno [C₁₄H₁₄BrN₂O⁺] 305.03).



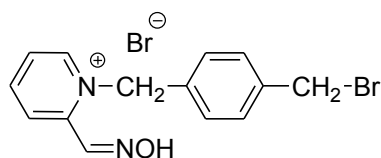
(12)

1-(2-bromomethylbenzyl)-3-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Reakční směs byla míchána 4,5h při teplotě varu acetonu pod zpětným chladičem. Výtěžek 91 %. TLC R_f 0.60, T.t. 189-190 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.30 (s, 1H, PyrH), 9.07 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, PyrH), 8.78 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, PyrH), 8.39 (s, 1H, -CH=NOH), 8.27-8.17 (m, 1H, PyrH), 7.60 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz, ArH), 7.55-7.41 (m, 2H, ArH), 7.37 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz, ArH), 6.12 (s, 2H, -CH₂-), 4.96 (s, 2H, -CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 144.68, 143.25, 142.48, 142.18, 137.19, 133.58, 131.93, 131.60, 130.62, 130.11, 129.68, 128.38, 60.31, 31.70. EA: vypočítáno 43.55 % C, 3.65 % H, 7.26 % N; nalezeno 43.67 % C, 3.91 % H, 7.32 % N. ESI-MS: m/z 305.0 [M^+] (vypočítáno [$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}^+$] 305.03).



(13)

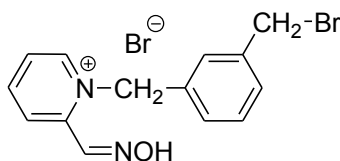
1-(4-bromomethylbenzyl)-2-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Reakční směs byla míchána 13h při teplotě varu acetonu pod zpětným chladičem. Výtěžek 19 %. TLC R_f 0.60, T.t. 186-188 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.24 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, H-6), 8.73 (s, 1H, -CH=NOH), 8.69-8.59 (m, 1H, H-5), 8.43 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-3), 8.26-8.17 (m, 1H, H-4), 7.49 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, Bn), 7.25 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, Bn), 6.11 (s, 2H, -CH₂-Br), 4.70 (s, 2H, -CH₂-N). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 147.11, 146.44, 145.92, 141.35, 138.69, 138.06, 133.87, 129.98, 129.54, 127.88, 127.55, 126.05, 59.93, 33.53. EA: vypočítáno 43.55 % C, 3.65 % H, 7.26 % N; nalezeno 43.07 % C, 3.45 % H, 7.48 % N. ESI-MS: m/z 305.0 [M^+] (vypočítáno [$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}^+$] 305.03).



13

(14)

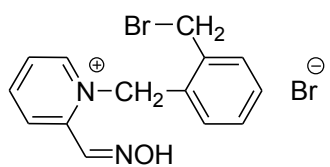
1-(3-bromomethylbenzyl)-2-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Reakční směs byla míchána 13h při teplotě varu acetonu pod zpětným chladičem. Výtěžek 21 %. TLC R_f 0.60, T.t. 198-200 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.24 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, H-6), 8.71 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 8.69-8.61 (m, 1H, H-5), 8.45 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-3), 8.27-8.18 (m, 1H, H-4), 7.50-7.38 (m, 2H, Bn), 7.33 (s, 1H, Bn-2), 7.20 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, Bn), 6.13 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Br}$), 4.67 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N}$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 147.14, 146.45, 145.96, 141.29, 139.10, 134.37, 129.73, 129.55, 127.91, 127.77, 127.06, 126.05, 59.96, 33.61. EA: vypočítáno 43.55 % C, 3.65 % H, 7.26 % N; nalezeno 43.18 % C, 3.67 % H, 7.22 % N. ESI-MS: m/z 305.0 [M^+] (vypočítáno [$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}^+$] 305.03).



14

(15)

1-(2-bromomethylbenzyl)-2-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: Reakční směs byla míchána 4h při teplotě varu acetonu pod zpětným chladičem. Výtěžek 29 %. TLC R_f 0.60, T.t. 170-172 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.06 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, H-6), 8.73-8.64 (m, 1H, H-5), 8.56-8.47 (m, 2H, $-\text{CH}=\text{NOH}$, H-3), 8.24-8.17 (m, 1H, H-4), 7.63 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, Bn), 7.47-7.30 (m, 2H, Bn-4,5), 6.64 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, Bn), 6.22 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Br}$), 4.95 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N}$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 147.38, 146.47, 146.19, 141.15, 135.39, 132.36, 131.37, 129.78, 129.26, 127.98, 126.83, 126.14, 57.94, 31.79. EA: vypočítáno 43.55 % C, 3.65 % H, 7.26 % N; nalezeno 43.57 % C, 3.76 % H, 7.49 % N. ESI-MS: m/z 305.0 [M^+] (vypočítáno [$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}^+$] 305.03).



15

3.3 Příprava biskvarterních solí

1-(4-brombutyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid (**A**; 0.5 g; 1.5 mmol) byl rozpuštěn v DMF (10 ml) nebo MeCN (30 ml) společně s odpovídajícím pyridinovým derivátem (3.0 mmol). Směs byla zahřívána při 70-100°C po dobu 2.5-23 hodin a poté ochlazena na laboratorní teplotu. K reakční směsi byl přidán nadbytek acetonu (50 ml) a byla uchována v chladicím boxu přes noc. Surový pevný produkt byl dekantován, kapalná část reakční směsi odlita, surový produkt převrstven MeCN (50 ml) a ponechán při laboratorní teplotě přes noc. Surový produkt byl filtrován za sníženého tlaku a rekrystalován z MeCN (schéma 5).

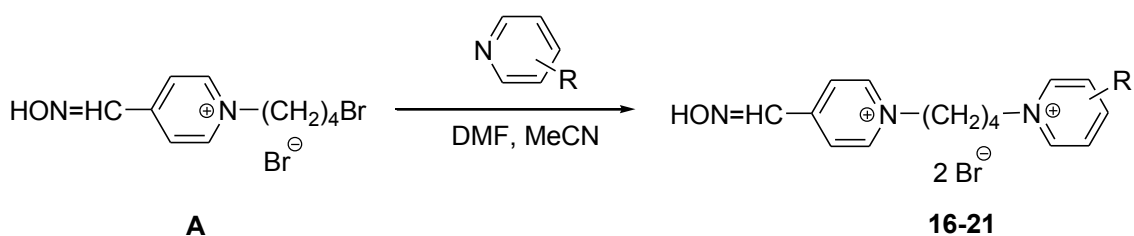
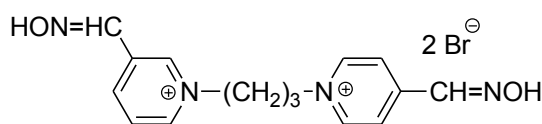


Schéma 5 Obecná příprava biskvarterních reaktivátorů acetylcholinesterasy.

3.3.1 Biskvarterní sloučeniny – alifatický spojovací řetězec

(16)

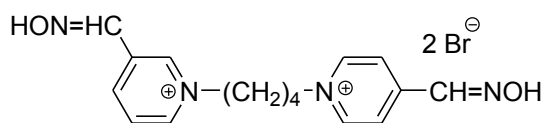
1-(3-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-hydroxyiminomethyl-pyridinium) propan-dibromid: Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 10 h. Výtěžek 35 %. TLC R_f 0.15, T.t. 206-208°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.19 (s, 1H, H-2), 9.00-8.91 (m, 3H, H-2',6,6'), 8.56 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-4), 8.28 (s, 1H, 3- $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.18 (s, 1H, 4- $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.09 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3',5'), 8.06-7.97 (m, 1H, H-5), 4.69-4.50 (m, 4H, N- CH_2 -), 2.33-2.29 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.52, 145.16, 145.05, 144.51, 143.22, 142.66, 141.72, 133.41, 128.16, 124.05, 57.65, 56.89, 31.50. EA: vypočítáno 40.38 % C, 4.07 % H, 12.56 % N; nalezeno 40.18 % C, 4.23 % H, 12.25 % N. ESI-MS: m/z 143.1 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno pro $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2/2]^{2+}$ 143.07).



16

(17)

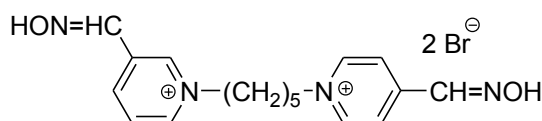
1-(3-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-butan-dibromid: Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 13h. Výtěžek 34 %. TLC R_f 0.15, T.t. 219-221°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.38 (s, 1H, H-2), 9.20-9.09 (m, 3H, H-2',6,6'), 8.74 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-4), 8.45 (s, 1H, 3- $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.36 (s, 1H, 4- $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.25 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3',5'), 8.22-8.15 (m, 1H, H-5), 4.83-4.61 (m, 4H, N- CH_2 -), 2.10-1.91 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.30, 145.02, 144.39, 143.22, 142.54, 141.42, 133.36, 128.10, 124.01, 59.97, 59.21, 26.93. EA: vypočítáno 41.76 % C, 4.38 % H, 12.18 % N; nalezeno 40.35 % C, 4.55 % H, 11.68 % N. ESI-MS: m/z 150.1 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno pro $[\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2/2]^{2+}$ 150.08).



17

(18)

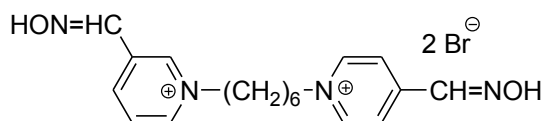
1-(3-hydroxyiminomethylpyridinium)-5-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-
pentan-dibromid: Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 16,5h. Výtěžek
45 %. TLC R_f 0.15, T.t. 236-237°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.40 (s,
1H, H-2), 9.21-9.11 (m, 3H, H-2',6,6'), 8.74 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-4), 8.46 (s, 1H, 3-
 $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.38 (s, 1H, 4- $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.26 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3',5'), 8.22-8.14 (m,
1H, H-5), 4.75-4.53 (m, 4H, N- CH_2 -), 2.11-1.89 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -), 1.41-1.25 (m,
2H, N-(CH_2) $_2$ - CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.26, 145.03, 144.41,
143.19, 142.54, 141.31, 133.36, 128.07, 123.96, 60.39, 59.59, 29.74, 21.70. EA:
vypočítáno 43.06 % C, 4.68 % H, 11.82 % N; nalezeno 39,61 % C, 4.55 % H, 10.77 %
N. ESI-MS: m/z 157.1 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno pro $[\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2/2]^{2+}$ 157.09).



18

(19)

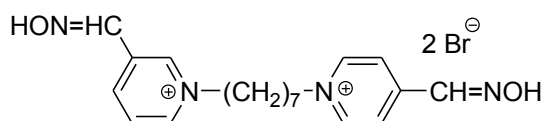
1-(3-hydroxyiminomethylpyridinium)-6-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-
hexan-dibromid: Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 14,5h. Výtěžek
33 %. TLC R_f 0.15, T.t. 225-227°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.38 (s,
1H, H-2), 9.19-9.10 (m, 3H, H-2',6,6'), 8.74 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-4), 8.45 (s, 1H, 3-
 $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.37 (s, 1H, 4- $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.25 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3',5'), 8.21-8.14 (m,
1H, H-5), 4.72-4.54 (m, 4H, N- CH_2 -), 2.02-1.84 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -), 1.42-1.26 (m,
4H, N-(CH_2) $_2$ - CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.22, 145.03, 144.36,
143.19, 142.50, 141.26, 133.33, 128.01, 123.93, 60.67, 59.90, 30.17, 24.61. EA:
vypočítáno 44.28 % C, 4.95 % H, 11.48 % N; nalezeno 44.33 % C, 5.05 % H, 11.42 %
N. ESI-MS: m/z 164.1 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno pro $[\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2/2]^{2+}$ 164.10).



19

(20)

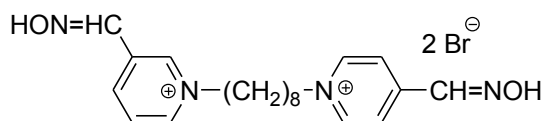
1-(3-hydroxyiminomethylpyridinium)-7-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-heptan-dibromid: Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 13,5h. Výtěžek 34 %. TLC R_f 0.15, T.t. 189-191°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.38 (s, 1H, H-2), 9.18-9.10 (m, 3H, H-2',6,6'), 8.73 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-4), 8.45 (s, 1H, 3- $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.37 (s, 1H, 4- $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.24 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3',5'), 8.21-8.14 (m, 1H, H-5), 4.70-4.55 (m, 4H, N- CH_2 -), 2.00-1.84 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -), 1.41-1.20 (m, 6H, N-(CH_2) $_3$ - CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.21, 145.03, 144.34, 143.19, 142.49, 141.24, 133.34, 128.02, 123.95, 60.79, 60.02, 30.36, 27.65, 24.98. EA: vypočítáno 45.44 % C, 5.22 % H, 11.16 % N; nalezeno 44.57 % C, 5.29 % H, 10.95 % N. ESI-MS: m/z 171.2 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno pro $[\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2/2]^{2+}$ 171.11).



20

(21)

1-(3-hydroxyiminomethylpyridinium)-8-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-oktan-dibromid: Reakce probíhala v DMF při 70°C a byla ukončena po 17h. Výtěžek 35 %. TLC R_f 0.2, T.t. 212-214°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.36 (s, 1H, H-2), 9.16-9.08 (m, 3H, H-2',6,6'), 8.73 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-4), 8.45 (s, 1H, 3- $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.36 (s, 1H, 4- $\text{CH}=\text{NOH}$), 8.24 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, H-3',5'), 8.21-8.14 (m, 1H, H-5), 4.70-4.53 (m, 4H, N- CH_2 -), 2.00-1.82 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -), 1.37-1.19 (m, 8H, N-(CH_2) $_3$ - CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.48, 145.17, 144.60, 143.48, 142.74, 141.53, 133.62, 128.29, 124.22, 61.11, 60.34, 30.75, 28.35, 25.46. EA: vypočítáno 46.53 % C, 5.47 % H, 10.85 % N; nalezeno 46.07 % C, 5.58 % H, 10.75 % N. ESI-MS: m/z 178.2 $[\text{M}/2]^{2+}$ (vypočítáno pro $[\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2/2]^{2+}$ 178.11).



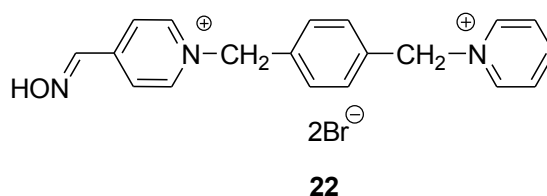
21

3.3.2 Biskvarterní sloučeniny – xylenový spojovací řetězec

(22)

4-hydroxyiminomethyl-1,1'-(1,4-fenylendimethyl)-bispyridinium-dibromid:

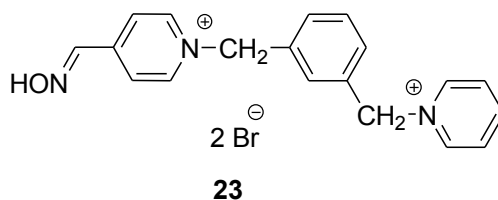
Reakční směs byla míchána 3 h v DMF při 70°C. Výtěžek 87 %. TLC R_f 0.1, T.t. 262-264 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.30 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2,6), 9.22 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2',6'), 8.70-8.59 (m, 1H, H-4'), 8.43 (s, 1H, -CH=NOH), 8.31-8.15 (m, 4H, H-3,5,3',5'), 7.72-7.60 (m, 4H, Ph), 5.95 (s, 2H, N-CH₂-), 5.90 (s, 2H, N'-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.73, 146.00, 145.00, 144.79, 135.31, 135.27, 129.54, 128.42, 124.33, 62.38, 61.93. EA: vypočítáno 49.06 % C, 4.12 % H, 9.03 % N; nalezeno 48.28 % C, 4.14 % H, 9.04 % N. ESI-MS: m/z 152.6 $[\text{M}]^{2+}$ (vypočítáno $[\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}]^{2+}$ 152.58).



(23)

4-hydroxyiminomethyl-1,1'-(1,3-fenylendimethyl)-bispyridinium-dibromid:

Reakční směs byla míchána 4.5 h v DMF při 70°C. Výtěžek 70 %. TLC R_f 0.1, T.t. 220-222 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.31 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2,6), 9.21 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2',6'), 8.71-8.61 (m, 1H, H-4'), 8.44 (s, 1H, -CH=NOH), 8.31-8.16 (m, 4H, H-3,5,3',5'), 7.81 (s, 1H, Ph-2), 7.64-7.46 (m, 3H, Ph-4-6), 5.95 (s, 2H, N-CH₂-), 5.90 (s, 2H, N'-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.86, 146.00, 144.99, 144.87, 135.13, 129.97, 129.53, 129.26, 128.39, 124.09, 62.51, 62.00. EA: vypočítáno 49.06 % C, 4.12 % H, 9.03 % N; nalezeno 48.91 % C, 4.22 % H, 9.21 % N. ESI-MS: m/z 152.6 $[\text{M}]^{2+}$ (vypočítáno $[\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}]^{2+}$ 152.58).

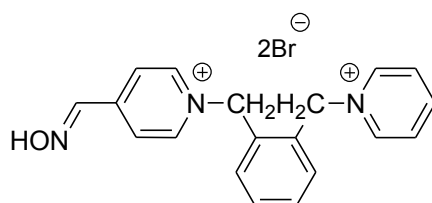


(24)

4-hydroxyiminomethyl-1,1'-(1,2-fenylendimethyl)-bispyridinium-dibromid:

Reakční směs byla míchána 12.5 h v DMF při 70°C. Výtěžek 63 %. TLC R_f 0.1, T.t. 203-205 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.17 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2,6),

9.10 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2',6'), 8.75-8.66 (m, 1H, H-4'), 8.50 (s, 1H, -CH=NOH), 8.36-8.19 (m, 4H, H-3,5,3',5'), 7.56-7.46 (m, 2H, Ph-3,6), 7.32-7.16 (m, 2H, Ph-4,5), 6.21 (s, 2H, N-CH₂-), 6.18 (s, 2H, N'-CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 149.00, 146.31, 145.33, 145.19, 132.75, 132.67, 130.06, 129.68, 128.50, 124.37, 60.02, 59.64. EA: vypočítáno 49.06 % C, 4.12 % H, 9.03 % N; nalezeno 48.91 % C, 4.66 % H, 8.33 % N. ESI-MS: m/z 152.6 [M]²⁺ (vypočítáno [C₁₉H₁₉N₃O]²⁺ 152.58).

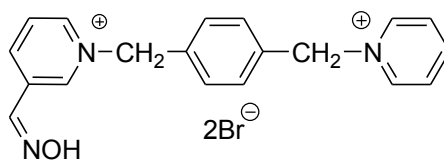


24

(25)

3-hydroxyiminomethyl-1,1'-(1,4-fenyldimethyl)-bispyridinium-dibromid:

Reakční směs byla míchána 4.5 h v DMF při 70°C. Výtěžek 76 %. TLC R_f 0.1, T.t. 221-223 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.46 (s, 1H, H-2), 9.29 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2',6'), 9.22 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz, H-6), 8.75 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-4), 8.68-8.60 (m, 1H, H-5), 8.36 (s, 1H, -CH=NOH), 8.24-8.15 (m, 3H, H-3'-5'), 7.70-7.63 (m, 4H, Ph), 5.94 (s, 4H, Ph, -CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 146.02, 144.82, 144.43, 143.20, 142.36, 141.99, 135.35, 135.09, 133.73, 129.63, 128.49, 62.70, 62.42. EA: vypočítáno 49.06 % C, 4.12 % H, 9.03 % N; nalezeno 46.89 % C, 4.55 % H, 8.64 % N. ESI-MS: m/z 152.6 [M]²⁺ (vypočítáno [C₁₉H₁₉N₃O]²⁺ 152.58).



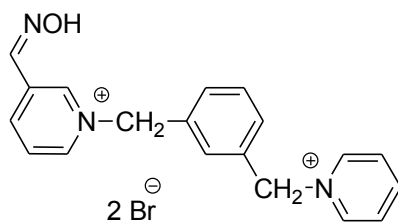
25

(26)

3-hydroxyiminomethyl-1,1'-(1,3-fenyldimethyl)-bispyridinium-dibromid:

Reakční směs byla míchána 7 h v DMF při 70°C. Výtěžek 40 %. TLC R_f 0.1, T.t. 199-201 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.47 (s, 1H, H-2), 9.30 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2',6'), 9.23 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz, H-6), 8.77 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-4), 8.70-8.61 (m, 1H, H-5), 8.40 (s, 1H, -CH=NOH), 8.26-8.16 (m, 3H, H-3'-5'), 7.82 (s, 1H, Ph-2), 7.64-7.48 (m, 3H, Ph-4-6), 5.95 (s, 4H, N-CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 146.02, 144.88, 144.52, 143.18, 142.49, 141.92, 135.10, 134.87, 133.70, 129.98,

129.64, 129.33, 128.40, 62.84, 62.53. EA: vypočítáno 49.06 % C, 4.12 % H, 9.03 % N; nalezeno 48.44 % C, 4.48 % H, 9.20 % N. ESI-MS: m/z 152.6 $[M]^{2+}$ (nalezeno $[C_{19}H_{19}N_3O]^{2+}$ 152.58).

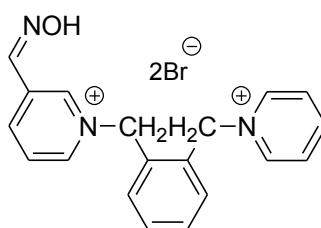


26

(27)

3-hydroxyiminomethyl-1,1'-(1,2-fenyldimethyl)-bispyridinium-dibromid:

Reakční směs byla míchána 4.5 h v DMF při 70°C. Výtěžek 53 %. TLC R_f 0.1, T.t. 199-200 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.48 (s, 1H, H-2), 9.30 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2',6'), 9.24 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz, H-6), 8.78 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-4), 8.71-8.61 (m, 1H, H-5), 8.40 (s, 1H, -CH=NOH), 8.27-8.16 (m, 3H, H-3'-5'), 7.83 (s, 1H, Ph-2), 7.66-7.48 (m, 3H, Ph-4-6), 5.95 (s, 4H, N-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 146.02, 144.88, 144.53, 143.18, 142.49, 141.91, 135.10, 134.87, 133.69, 129.98, 129.64, 129.35, 128.40, 62.83, 62.51. EA: vypočítáno 49.06 % C, 4.12 % H, 9.03 % N; nalezeno 48.79 % C, 4.40 % H, 9.23 % N. ESI-MS: m/z 152.6 $[M]^{2+}$ (vypočítáno $[C_{19}H_{19}N_3O]^{2+}$ 152.58).



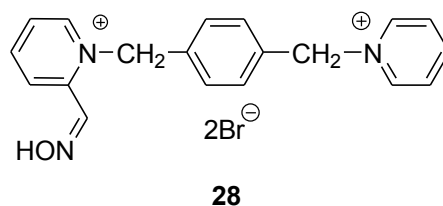
27

(28)

2-hydroxyiminomethyl-1,1'-(1,4-fenyldimethyl)-bispyridinium-dibromid:

Reakční směs byla míchána 16.5 h v DMF při 70°C. Výtěžek 80 %. TLC R_f 0.1, T.t. 209-211 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.29 (d, 3H, $J = 5.9$ Hz, H-2',6',6), 8.73 (s, 1H, -CH=NOH), 8.69-8.58 (m, 3H, H-3,3',5'), 8.43 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-5), 8.27-8.13 (m, 2H, H-4, 4'), 7.70-7.57 (m, 4H, Ph), 5.94 (s, 4H, Ph, -CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 147.09, 146.45, 146.03, 144.80, 141.32, 135.31, 134.87, 129.53, 128.42, 126.05, 62.36, 59.69. EA: vypočítáno 49.06 % C, 4.12 % H,

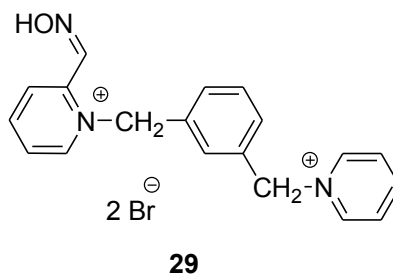
9.03 % N; nalezeno 49.15 % C, 4.20 % H, 8.31 % N. ESI-MS: m/z 152.6 $[M]^{2+}$ (vypočítáno $[C_{19}H_{19}N_3O]^{2+}$ 152.58).



(29)

2-hydroxyiminomethyl-1,1'-(1,3-fenyldimethyl)-bispyridinium-dibromid:

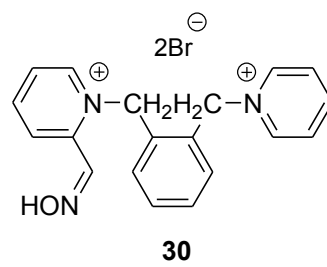
Reakční směs byla míchána 4 h v DMF při 70°C. Výtěžek 88 %. TLC R_f 0.1, T.t. 204-205 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.29 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz, H-6), 9.25 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2',6'), 8.72-8.61 (m, 3H, -CH=NOH; H-3,5), 8.46-8.39 (m, 1H, H-4), 8.27-8.14 (m, 3H, H-3'-5'), 7.61-7.45 (m, 3H, Ph-4-6), 7.30 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, Ph-3), 6.15 (s, 2H, N-CH₂-), 5.92 (s, 2H, N'-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 147.09, 146.55, 146.03, 144.73, 141.35, 135.15, 134.89, 130.03, 129.18, 128.40, 128.10, 127.92, 127.72, 126.13, 62.48, 59.93. EA: vypočítáno 49.06 % C, 4.12 % H, 9.03 % N; nalezeno 48.65 % C, 4.82 % H, 8.73 % N. ESI-MS: m/z 152.6 $[M]^{2+}$ (vypočítáno $[C_{19}H_{19}N_3O]^{2+}$ 152.58).



(30)

2-hydroxyiminomethyl-1,1'-(1,2-fenyldimethyl)-bispyridinium-dibromid:

Reakční směs byla míchána 5 h v DMF při 70°C. Výtěžek 28 %. TLC R_f 0.1, T.t. 187-189 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9.22 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-2',6'), 9.05 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz, H-6), 8.78-8.66 (m, 3H, -CH=NOH; H-3',5'), 8.57 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-3), 8.33-8.16 (m, 3H, H-4,4',5), 7.54-7.36 (m, 2H, Ph-4,5), 7.25 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, Ph-3), 6.62 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, Ph-6), 6.36 (s, 2H, N'-CH₂-), 6.20 (s, 2H, N-CH₂-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 147.70, 146.29, 146.06, 145.25, 141.32, 132.42, 131.75, 130.06, 129.52, 129.33, 128.50, 128.12, 126.32, 126.02, 60.03, 57.90. EA: Vypočítáno 49.06 % C, 4.12 % H, 9.03 % N; nalezeno 49.13 % C, 4.55 % H, 8.97 % N. ESI-MS: m/z 152.6 $[M]^{2+}$ (vypočítáno $[C_{19}H_{19}N_3O]^{2+}$ 152.58).



4 Stanovení reaktivčních parametrů potenciostatickou metodou in vitro

4.1 Princip metody

Enzym acetylcholinesterasa (AChE) štěpí substrát, acetylcholin-jodid (AChI), za vzniku cholinu (Ch) a kyseliny octové (schéma 6).

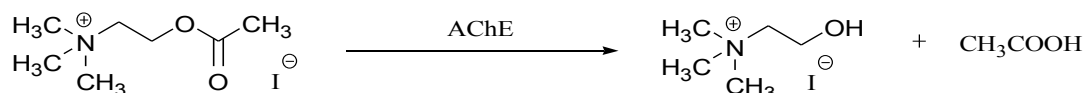


Schéma 6 Enzymatická přeměna acetylcholinu.

Při reakci AChE s OF dochází k ireverzibilní inhibici AChE (schéma 7).

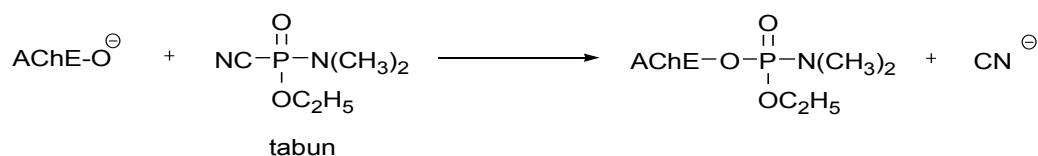


Schéma 7 Ireverzibilní inhibice acetylcholinesterasy tabunem.

Reakci inhibované AChE s oximátovým anionem dochází k reaktivaci enzymu (schéma 8).

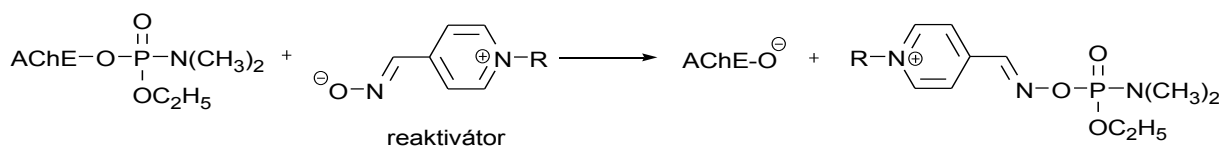


Schéma 8 Reaktivace acetylcholinesterasy inhibované tabunem.

Při potenciostatickém měření je roztokem NaOH titrována uvolněná kyselina octová. Ze spotřeby NaOH je možné určit aktivitu AChE (a_0), inhibované AChE (a_i) a reaktivované AChE (a_r).

4.2 Postup měření

Homogenát z mozků laboratorního potkana (10% ve vodě; 0.5 ml) byl smíchán s isopropylalkoholovým roztokem OFI (20 μ l), destilovanou vodou (0.5 ml) a inkubován ve zkumavce za teploty 25 °C po dobu 30 minut (pH 7.6). Inkubovaná směs byla přelita do roztoku chloridu sodného (3 mol/l; 2.5 ml) a destilované vody (18.5 ml), zkumavka byla vypláchnuta destilovanou vodou (1 ml). Nakonec byl přidán roztok acetylcholin-jodidu (0.02 mol/l; 2 ml). Enzymová aktivita byla měřena při pH 8.0 a teplotě 25 °C na autotitrátoru Titrand 842 (Metrohm, Švýcarsko). Aktivity intaktního (a_0) a inhibovaného enzymu (a_i) byly odečteny ze závislosti spotřeby roztoku NaOH (0.01 mol/l) na čase.

V případě reaktivace inhibované AChE byla směs inkubována dalších 10 minut s roztokem reaktivátoru (10^{-3} mol/l nebo 10^{-5} mol/l; 0.2 ml) a destilovanou vodou (0.8 ml). Poté byla inkubovaná směs přelita do roztoku chloridu sodného (3 mol/l; 2.5 ml) a destilované vody (17.5 ml), zkumavka byla vypláchnuta destilovanou vodou (1 ml). Byl přidán roztok acetylcholinjodidu (0.02 mol/l; 2 ml) a aktivita reaktivované AChE (a_r) byla opět odečtena ze závislosti spotřeby NaOH na čase. Účinnost daného reaktivátoru *in vitro* byla vypočítána podle vzorce:

$$x = \left(1 - \frac{a_0 - a_r}{a_0 - a_i} \right) \cdot 100 \quad [\%]$$

4.3 Výsledky měření *in vitro*

Všechny reaktivátory AChE byly testovány *in vitro* při dvou koncentracích (10^{-3} mol/l a 10^{-5} mol/l). Jako OF byla zvolena NPL tabun a pesticid paraoxon. Jako srovnávací reaktivátory byly zvoleny sloučeniny pralidoxim, HI-6 a obidoxim. Průměrné výsledky tří na sobě nezávislých *in vitro* měření se směrodatnou odchylkou pro každý reaktivátor jsou uvedeny v tabulce 1.

Inhibitor	Reaktivace (%)			
	tabun		paraoxon	
	10 ⁻³ mol/l	10 ⁻⁵ mol/l	10 ⁻³ mol/l	10 ⁻⁵ mol/l
pralidoxim	4±1	0	42 ± 1	0
HI-6	2±1	4±1	35 ± 2	0
obidoxim	11±0	0	76 ± 2	37 ± 2
16	0	0	56 ± 1	30 ± 1
17	0	0	27 ± 1	24 ± 1
18	0	0	32 ± 1	30 ± 1
19	7± 1	0	8 ± 1	13 ± 1
20	1± 1	0	3 ± 1	10 ± 1
21	0	0	0	1 ± 0
22	0	2± 1	22 ± 2	14 ± 1
23	0	0	7 ± 1	9 ± 2
24	0	0	0	0
25	0	5± 1	0	0
26	0	2± 1	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	74 ± 1	43 ± 1
29	0	0	56 ± 1	17 ± 1
30	0	0	0	0

Tab. 1 Výsledky reaktivace testovaných sloučenin (%; průměrná hodnota tří nezávislých měření).

5 Diskuze

Reaktivací účinek testovaných sloučenin je závislý na struktuře použitého OF [32]. Mimo to reaktivátory určené pro testování *in vivo* by měly dosáhnout alespoň 10 % reaktivací účinnosti při testování *in vitro* [48]. Je velmi těžké reaktivovat AChE inhibovanou tabunem [35]. Volný elektronový pár na amidické skupině tabunu v komplexu tabun-AChE ztěžuje nukleofilní atak reaktivátoru [49]. Navíc dochází k některým strukturním změnám uvnitř aktivního místa tabunem inhibované AChE [35]. V testované skupině, kde byla AChE inhibována tabunem, pouze referenční obidoxim dokázal překonat 10 % hranici účinnosti a to při koncentraci 10^{-3} mol/l. Žádná z testovaných sloučenin nevykázala dostatečnou účinnost při koncentraci 10^{-5} mol/l.

Naopak pesticidy (paraoxon) jsou známy jako méně účinné inhibitory AChE v porovnání s NPL [32]. Bylo zjištěno, že běžně užívané reaktivátory pro terapii otrav NPL nejsou vhodné k terapii otravy pesticidy [50]. Všechny referenční sloučeniny reaktivovaly paraoxonem inhibovanou AChE velmi dobře při koncentraci 10^{-3} mol/l, ale pouze obidoxim dokázal reaktivovat AChE při koncentraci 10^{-5} mol/l. Nově připravené sloučeniny vykazaly různý reaktivací potenciál. Sloučeniny s alifatickým spojovacím řetězcem reaktivovaly AChE s klesajícím účinkem (**16-21**). Při obou koncentracích se jako neúčinnější jevila sloučenina **16**, žádná ze sloučenin však nebyla účinnější než obidoxim. Sloučenina s nejdelším spojovacím řetězcem (**21**) AChE nereaktivovala. Z uvedených výsledků dále vyplývá, že sloučeniny s xylenovým spojovacím řetězcem (**22, 28, 29**) vykazaly dobrý reaktivací účinek, sloučenina **28** navíc v koncentraci 10^{-5} mol/l větší než referenční sloučenina obidoxim. Lze ji proto doporučit k dalšímu testování. Ostatní sloučeniny nepřesáhly hranici 10 % účinnosti nebo AChE nereaktivovaly.

Z uvedených výsledků vyplývají skutečnosti pro vztah mezi strukturou a aktivitou reaktivátorů AChE. Oximová skupina ruší fosforylaci AChE, a proto je esenciální pro účinek reaktivátoru [51]. Všechny připravené sloučeniny proto obsahují oximové uskupení. Pozice hydroxyiminomethylových skupin ovlivňuje proces reaktivace [52]. Přítomnost kvarterního dusíku je nezbytná pro afinitu k enzymu [53]. Připravené sloučeniny obsahují dva kvarterní dusíky, a proto mají větší afinitu k AChE než sloučeniny monokvarterní. Délka a struktura spojovacího řetězce mezi pyridiniovými zbytky je dalším důležitým faktorem [54]. Ve skupině sloučenin s alifatickým spojovacím řetězcem klesala účinnost s rostoucí délkou řetězce. Nejvíce

účinné sejevily sloučeniny se 3 až 4 vazbami uhlík-uhlík. Delší řetězec než 5 vazeb uhlík-uhlík vedl k postupné ztrátě účinku. U sloučenin s xylenovým spojovacím řetězcem byla AChE reaktivována sloučeninami s hydroxyiminomethylovou skupinou v poloze 2 nebo 4 a s m-fenylenovou nebo p-fenylenovou skupinou. Z výsledků dále vyplývá, že k reaktivačnímu účinku není nezbytná hydroxyiminomethylová skupina na obou heteroaromatických jádrech, účinné jsou i sloučeniny s jednou funkční skupinou.

Autor diplomové práce se podílel na publikování výsledků v odborných časopisech (viz. oddíl 7.1).

6 Závěr

Bylo připraveno 15 nových potenciálních reaktivátorů acetylcholinesterasy s různými typy spojovacího řetězce mezi pyridiniovými jádry. Poté byla stanovena jejich reaktivační aktivita potenciometrickou metodou *in vitro*. Z naměřených dat vyplynulo, že žádná sloučenina nedokázala reaktivovat tabunem inhibovanou AChE v potřebné míře. Naopak byly nalezeny sloučeniny, které dokázaly reaktivovat paraoxonem inhibovanou AChE při obou měřených koncentracích – sloučeniny s alifatickým spojovacím řetězcem **16**, **17**, **18** a sloučeniny s xylenovým spojovacím řetězcem **22**, **28**, **29**. Nejúčinnější se ukázala sloučenina **28**, která v koncentraci 10^{-5} mol/l překonala aktivitu referenční látky obidoximu.

7 Přílohy

7.1 Lett. Org. Chem. 2006

Letters in Organic Chemistry, 2006, 3, 831-835

831

Synthesis of Bispyridinium Compounds Bearing Propane Linker and Evaluation of their Reactivation Activity against Tabun- and Paraoxon-Inhibited Acetylcholinesterase

Kamil Musilek^{a,b}, Ondrej Holas^b, Jan Hambalek^b, Kamil Kuca^{*,a,c}, Daniel Jun^{a,c}, Vlastimil Dohnal^d and Martin Dolezal^b

^aDepartment of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

^bDepartment of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^cCenter of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

^dDepartment of Food Technology, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

Received July 24, 2006; Revised November 01, 2006; Accepted November 15, 2006

Abstract: Six AChE reactivators with propane linker were synthesized using modification of currently known synthetic pathways. Their potency to reactivate AChE inhibited by nerve agent tabun and insecticide paraoxon was tested *in vitro*. The reactivation efficacies of pralidoxime, HI-6, obidoxime and six synthesized reactivators were compared. According to the results obtained, three reactivators seem to be promising against paraoxon-inhibited AChE. Better results were obtained for bisquaternary substances at least with one oxime group in position four. None of the tested substances was able to satisfactorily reactivate tabun-inhibited AChE.

Keywords: Acetylcholinesterase, reactivation, tabun, paraoxon, reactivator, oxime.

Organophosphorus compounds (OPC) are commonly known as nerve agents (soman, sarin, tabun, VX etc.), pesticides (chlorpyrifos, paraoxon, diazinon etc.), substances used for industrial purposes (tributylphosphate) or as therapeutic drugs (metrifonate) (Fig. 1) [1-4]. Their chemical structure is derived from phosphonic and phosphoric acids or their thio-analogues respectively [1-2]. They are able to inhibit enzyme acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) irreversibly via phosphorylation or phosphorylation of serine hydroxyle in enzyme's active site (Scheme 1) [1-2]. The enzyme can not fulfil its physiological function (cleavage of the neuromediator acetylcholine necessary to terminate cholinergic transmission). The accumulated acetylcholine causes cholinergic overstimulation and subsequent cholinergic crisis which ending to the block of breathing centre and subsequent death [2]. The threat of intoxications by these compounds rapidly increases with growing agricultural production and with menace of terrorist attacks [5-6].

Anticholinergic drugs such as atropine are used to counteract the effects of OPC at cholinergic receptors [7]. However, they are not able to treat the inhibited enzyme. For this reason, the AChE reactivators are used to cleave the covalent bond OPC-enzyme by nucleophilic attack and to restore the activity of AChE (Scheme 2) [2]. The commonly

used reactivators are monoquaternary or bisquaternary substances carrying hydroxyiminomethyl (oxime) group as nucleophilic agent, e.g. pralidoxime (1, 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium chloride), oxime HI-6 (2, 1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-carbamoylpyridinium)-2-oxapropane dichloride), obidoxime (3, Toxogonine[®], 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropane dichloride) (Fig. 2) [8-11]. There is none broad spectrum reactivator after more than fifty years of investigations [12-14]. Therefore, the development and selection of new effective reactivators of AChE are very important.

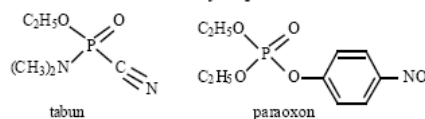
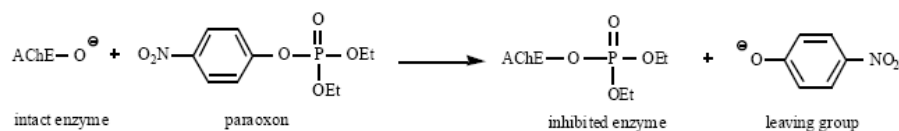


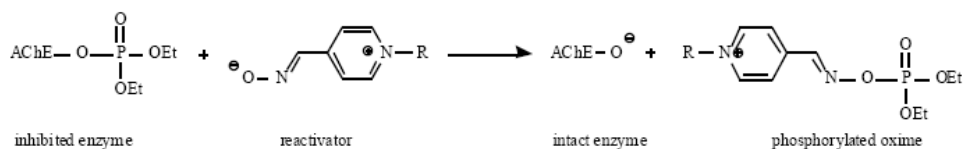
Fig. (1). Structural formulae of organophosphorus compounds used.

In this work, the six substances bearing propane connecting chain are presented (Fig. 3). Three symmetrical substances (4-6) were prepared and described earlier in our laboratory [15]. Moreover, three non-symmetrical compounds (7-9) were prepared according to conventional synthetic procedures [16-17]. At first, the monoquaternary salts (10-12) were synthesized using excess of five equivalent of 1,3-dibromopropane in acetone, where bi-products occurs only in minor yields (Scheme 3). The mono-salts were purified by recrystallization from acetonitrile (MeCN), where bis-salts were almost insoluble [17]. Secondly, the

*Address correspondence to this author at the Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic; Tel: +420-973-251-523; Fax: +420-495-518-094; E-mail: kucakam@pmfhk.cz; kucakam@seznam.cz



Scheme 1. AChE inhibited by pesticide paraoxon.



Scheme 2. Oxime induced reactivation by paraoxon-inhibited AChE.

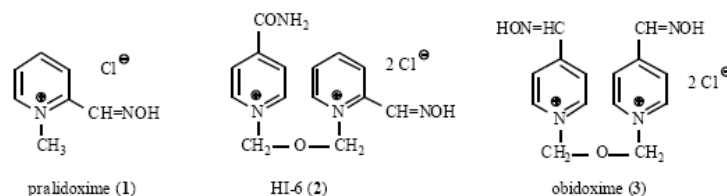


Fig. (2). Structural formulae of reactivators currently used against OPC intoxications in clinical practise.

bisquaternary substances were completed in DMF using double excess of corresponding hydroxyiminomethylpyridine (Scheme 3). One of these non-symmetrical substances was not previously published (8) and the six substances were not presented altogether. Moreover, the known literature does not contain satisfactory experimental data but only yield, melting point and elementary analysis [18-22]. In our case, the reaction conditions and yields were exactly described especially in contrast to the foregoing literature data [21]; NMR and MS analysis were firstly added. The compounds were tested *in vitro* on tabun (GA) and paraoxon-inhibited AChE.

Compound	Oxime position
4	2,2'-CH=NOH
5	3,3'-CH=NOH
6	4,4'-CH=NOH
7	2,3'-CH=NOH
8	2,4'-CH=NOH
9	3,4'-CH=NOH

Fig. (3). Reactivators tested against tabun and paraoxon-inhibited AChE.

In vitro testing of synthesized oximes involved a standard collection of experimental procedures. The 10% rat brain homogenate (source of AChE) in water was inhibited by GA or paraoxon to achieve 95% inhibition of AChE. After 30 min of incubation with OPC, the reactivator was

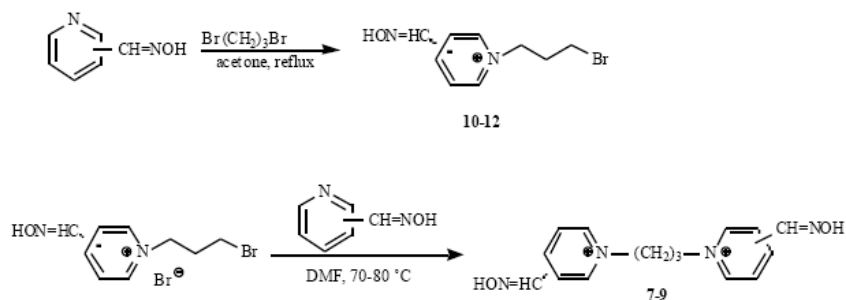
added to the solution for the next 10 min. Activities of intact AChE (a_0), inhibited AChE (a_i) and reactivated AChE (a_r) were derived from the influence of consumption of NaOH solution (0.01 M) on time. The percentage of reactivation (%) was calculated from the measured data according to the formula:

$$x = \left(\frac{a_0 - a_r}{a_0 - a_i} \right) \cdot 100 [\%]$$

The whole method was described in detail previously [23]. Pralidoxime, HI-6 and obidoxime of HPLC purity previously synthesized in our laboratory were used as references. Obtained data are summarized in Table I.

The reactivation potency of tested compounds depends on the structure of the OPC inhibitor [2, 14-17]. Moreover, reactivator suitable for *in vivo* experiments should exceed 10 % activity *in vitro* [24]. Therefore, it is extraordinarily difficult to reactivate AChE inhibited by nerve agent GA [25-27]. The lone electron pair located on the amidic group makes the nucleophilic attack almost impossible [26]. In addition, some structural changes occur in the cavity of GA-inhibited enzyme [27]. In the tested group, there are only two reactivators able to exceed 10 % reactivation at 10^{-3} M concentration. They both are well known oximes – obidoxime (3) and trimedoxime (6). No tested compound showed satisfactory results at the concentration 10^{-5} M.

On the other hand, pesticides are known as less potent inhibitors of AChE than the nerve agents [2, 29]. It was found that commonly used "nerve agent's" reactivators are not suitable for pesticide intoxications treatment [30-31]. All reference substances show ability in reactivation of paraoxon-inhibited AChE at the concentration 10^{-3} M with one exception (5). However, there are only five compounds with reactivation ability at 10^{-3} M concentration which is more



Scheme 3. Two step synthesis of non-symmetrical bisquaternary compounds.

appropriate for human use. Trimedoxime (**6**) seems to be the most promising reactivator against paraoxon-inhibited AChE at 10^{-5} M followed by two compounds (**8-9**) which exceed obidoxime (**3**). Pralidoxime (**1**) and HI-6 (**2**) did not show sufficient efficacy at the concentration 10^{-5} M for paraoxon-inhibited AChE. Moreover, the interesting phenomenon has been found: these substances show higher reactivation ability at lower concentration. It is probably caused by coincident reactivation and inhibition of the enzyme by reactivator itself as was described earlier [14, 16-17].

Consequently, we can recommend following structural factors appropriate for reactivation of paraoxon-inhibited AChE by known and synthesized compounds [14]:

- The oxime functional group breaks down the bond OPC inhibitor-enzyme and it is essential for activity of the reactivator [32-36].
- Our results confirm that position and amount of hydroxyiminomethyl groups influence the reactivation potency [16-17, 32-33].
- The symmetrical substances with oximes in positions 2-2 and 3-3 showed less activity than in positions 4-4 (trimedoxime, **6**).

- In the case of non-symmetrical oximes, there is an increasing activity in the line of mixed positions 2-3, 2-4 and 3-4.
- None of non-symmetrical compounds is superior to trimedoxime (**6**).
- Length and structure of connecting chain is another important factor for the activity of the reactivator [14, 16-17]. The propane and butane connecting chain were earlier found to be promising for tabun-inhibited AChE [37].
- Moreover, quaternary nitrogen is important for affinity to the enzyme.

In conclusion, series of six reactivators was prepared in satisfactory yield and purity. Their ability to reactivate GA and paraoxon-inhibited AChE was measured *in vitro*. Three compounds were found to be promising against paraoxon-inhibited AChE at concentrations accessible after administration *in vivo*. Pralidoxime and HI-6 were found to be not suitable for pesticide's inhibition of AChE. The reactivation potency of these compounds depends on structural factors such as position of the functional oxime group at the pyridinium ring, presence of quaternary nitrogen and the constitution of the linking chain.

Table 1. Reactivation Potencies of Tested Oximes. The Results by Mean of Three Independent Determinations. Time of Inhibition – 30 min; Time of Reactivation – 10 min; pH 8; Temperature 25 °C

Inhibitor Reactivator/Concentration	Reactivation (%)			
	Tabun		Paraoxon	
	10^{-3} M	10^{-5} M	10^{-3} M	10^{-5} M
pralidoxime (1)	4 ± 1	0	42 ± 1	0
HI-6 (2)	2 ± 1	4 ± 1	35 ± 2	0
obidoxime (3)	11 ± 0	0	76 ± 2	37 ± 2
4	0	0	16 ± 1	0
5	0	0	9 ± 0	0
6	30 ± 0	0	46 ± 1	50 ± 4
7	0	0	33 ± 1	12 ± 0
8	0	0	25 ± 0	38 ± 0
9	8 ± 0	0	41 ± 1	43 ± 2

EXPERIMENTAL

Solvents and reagents were purchased from Fluka and Sigma-Aldrich and used without further purification. Reactions were monitored by TLC using DC-Alufolien Cellulose F (Merck, Germany) and mobile phase BuOH-CH₃COOH-H₂O 5:1:2, detection by solution of Dragendorff reagent (*Eur. Ph. 5.0*, Vol. 1, p. 398, standard solution was additionally dissolved in 10 ml of acetic acid and 50 ml of water) Melting points were measured on micro heating stage PHMK 05 (VEB Kombinat Nagema, Radebeul, Germany) and were uncorrected. NMR spectra were generally recorded at Varian Gemini 300 (¹H 300 MHz, ¹³C 75 MHz, Palo Alto CA, USA). In all cases, the chemical shift values for ¹H spectra were reported in ppm (δ) relative to residual CHD₂SOCD₃ (δ 2.50), shift values for ¹³C spectra were reported in ppm (δ) relative to solvent peak dimethylsulfoxide - d₆ δ 39.43. Mass spectra were recorded using combination of high performance liquid chromatography and mass spectrometry. HP1100 HPLC system was obtained from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). It consisted of vacuum degasser G1322A, quaternary pump G1311A, autosampler G1313A and quadrupole mass spectrometer MSD1456 VL equipped with electrospray ionization source. Nitrogen for mass spectrometer was supplied by Whatman 75-720 nitrogen generator. Data were collected in positive ion mode with an ESI probe voltage of 4000 V. The pressure of nebulizer gas was set up to 35 psig. Drying gas temperature was operated at 335 °C and flow at 13 l/min.

Preparation of Quaternary Salts

We used two synthetic pathways for the preparation of bisquaternary aldoximes (Scheme 3).

(A) Preparation of Monoquaternary Salts

A solution of the hydroxyiminomethylpyridine (4.0 g, 32.8 mmol) and 1,3-dibromopropane (16.7 ml, 163.8 mmol) in acetone (30 ml) was stirred at reflux. The reaction mixture was cooled to the room temperature; the crystalline crude product was collected by filtration, washed with acetone (3×20 ml) and recrystallized from MeCN.

(B) Preparation of Bisquaternary Salts

A solution of the monoquaternary salt (0.50 g, 1.5 mmol) and hydroxyiminomethylpyridine (0.38 g, 3.0 mmol) in DMF (10 ml) was stirred at 70-80 °C. The reaction mixture was cooled to the room temperature and portioned with acetone (50 ml); the crystalline crude product was collected by filtration, washed with acetone (3×20 ml) and recrystallized from MeCN.

1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(3-hydroxyiminomethylpyridinium)-propane dibromide (7). Prepared by method B *via* (10). The reaction mixture was stirred at 80 °C and stopped after 7 h. Yield 0.34 g (49%), TLC R_f 0.15, m.p. 156-158 °C (reported 248 °C) [21]. ¹H NMR spectrum (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.27 (s, 1H, PyrH), 9.11-9.02 (m, 2H, PyrH), 8.77 (s, 1H, -CH=NOH), 8.67 (d, 1H, J = 8.0 Hz, PyrH), 8.55-8.45 (m, 1H, PyrH), 8.36 (d, 1H, J = 8.0 Hz, PyrH), 8.29 (s, 1H, -CH=NOH), 8.18-8.02 (m, 2H, PyrH), 4.89-4.70 (m, 4H, N-CH₂-), 2.44-2.39 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-). ¹³C NMR spectrum (75 MHz, DMSO

d₆): δ (ppm) 147.13, 145.81, 145.38, 144.40, 143.26, 142.53, 141.84, 141.29, 133.37, 128.17, 127.45, 125.65, 57.66, 54.47, 31.31. EA: calculated 40.38% C, 4.07% H, 12.56% N; found 40.42% C, 4.17% H, 12.51% N. ESI-MS: m/z 285.1 [M²⁺-H⁺]⁺ (calculated for [C₁₅H₁₈N₄O₂²⁺-H⁺]⁺ 286.14).

1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-propane dibromide (8). Prepared by method B *via* (10). The reaction mixture was stirred at 80 °C and stopped after 7 h. Yield 0.37 g (54%), TLC R_f 0.15, m.p. 231-233 °C (reported 218.5 °C) [19]. ¹H NMR spectrum (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.12 (d, 1H, J = 6.3 Hz, PyrH), 9.07 (d, 2H, J = 6.5 Hz, PyrH), 8.80 (s, 1H, -CH=NOH), 8.57-8.48 (m, 1H, PyrH), 8.44-8.34 (m, 2H, PyrH + -CH=NOH), 8.23 (d, 2H, J = 6.5 Hz, PyrH), 8.13-8.05 (m, 1H, PyrH), 4.84 (t, 2H, J = 7.4 Hz, N-CH₂-), 4.75 (t, 2H, J = 7.4 Hz, N-CH₂-), 2.46-2.41 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-). ¹³C NMR spectrum (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 148.49, 147.13, 145.37, 145.09, 141.31, 127.46, 125.69, 124.08, 58.87, 54.46, 31.33. EA: calculated 40.38% C, 4.07% H, 12.56% N; found 40.48% C, 4.19% H, 12.42% N. ESI-MS: m/z 285.1 [M²⁺-H⁺]⁺ (calculated for [C₁₅H₁₈N₄O₂²⁺-H⁺]⁺ 286.14).

1-(3-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-propane dibromide (9). Prepared by method B *via* (11 or 12). The reaction mixture was stirred at 70 °C and stopped after 10 h. Yield 0.24 g (35%), TLC R_f 0.15, m.p. 206 °C (reported 208 °C) [21]. ¹H NMR spectrum (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.19 (s, 1H, PyrH), 9.00-8.91 (m, 3H, PyrH), 8.56 (d, 1H, J = 8.0 Hz, PyrH), 8.28 (s, 1H, -CH=NOH), 8.18 (s, 1H, -CH=NOH), 8.09 (d, 2H, J = 6.0 Hz, PyrH), 8.06-7.97 (m, 1H, PyrH), 4.69-4.50 (m, 4H, N-CH₂-), 2.33-2.29 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-). ¹³C NMR spectrum (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 148.52, 145.16, 145.05, 144.51, 143.22, 142.66, 141.72, 133.41, 128.16, 124.05, 57.65, 56.89, 31.50. EA: calculated 40.38% C, 4.07% H, 12.56% N; found 40.18% C, 4.23% H, 12.25% N. ESI-MS: m/z 285.1 [M²⁺-H⁺]⁺ (calculated for [C₁₅H₁₈N₄O₂²⁺-H⁺]⁺ 286.14).

1-(3-bromopropyl)-2-hydroxyiminomethylpyridinium bromide (10). Prepared by method A. The reaction mixture was stopped after 75 h. Yield 0.86 g (8%), TLC R_f 0.5, m.p. 162-165 °C. ¹H NMR spectrum (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.30 (d, 1H, J = 5.6 Hz, PyrH), 9.07 (d, 1H, J = 6.0 Hz, PyrH), 8.76 (s, 1H, -CH=NOH), 8.53-8.45 (m, 1H, PyrH), 8.35-8.24 (m, 1H, PyrH), 6.27-6.20 (m, 2H, -CH₂-Br), 5.48-5.32 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-). ¹³C NMR spectrum (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 163.19, 148.66, 145.87, 145.04, 130.45, 125.87, 60.81, 60.27, 34.39. EA: calculated 33.36% C, 3.73% H, 8.65% N; found 33.59% C, 3.82% H, 8.98% N. ESI-MS: m/z 243.1 [M⁺] (calculated for [C₉H₁₂BrN₂O⁺] 243.01).

1-(3-bromopropyl)-3-hydroxyiminomethylpyridinium bromide (11). Prepared by method A. The reaction mixture was stopped after 8 h. Yield 6.21 g (59%), TLC R_f 0.5, m.p. 141-144 °C (reported 147.5 °C) [20]. ¹H NMR spectrum (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9.29 (s, 1H, PyrH), 9.07 (d, 1H, J = 6.0 Hz, PyrH), 8.71 (d, 1H, J = 8.0 Hz, PyrH), 8.32 (s, 1H, -CH=NOH), 8.18-8.11 (m, 1H, PyrH), 4.72 (t, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-Br), 3.57 (t, 2H, J = 6.6 Hz, N-CH₂-), 2.49-2.44 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-). ¹³C NMR spectrum (75

MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 144.57, 143.22, 142.80, 141.52, 133.40, 128.10, 59.71, 32.95, 30.15. EA: calculated 33.36% C, 3.73% H, 8.65% N; found 33.96% C, 3.85% H, 8.91% N. ESI-MS: m/z 243.1 [M^+] (calculated for $[C_9H_{12}BrN_2O^+]$ 243.01).

1-(3-bromopropyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium bromide (12). Prepared by method A. The reaction mixture was stopped after 8 h. Yield 7.64 g (72%), TLC R_f 0.5, m.p. 184-186 °C (reported 166.5-167, 181-182, 178-181 °C) [18, 21, 22]. 1H NMR spectrum (300 MHz, DMSO d_6) is consistent with literature data (22). ^{13}C NMR spectrum (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148.45, 145.19, 145.04, 124.02, 58.91, 32.98, 30.15. EA: calculated 33.36% C, 3.73% H, 8.65% N; found 33.26% C, 3.84% H, 8.80% N. ESI-MS: m/z 243.1 [M^+] (calculated for $[C_9H_{12}BrN_2O^+]$ 243.01).

Biochemistry

The 10% rat brain homogenate was used as a source of AChE. The brain homogenate (0.5 ml) was mixed with 20 μ l of isopropanol solution of tabun (*O*-ethyl-*N,N*-dimethylphosphoramidocyanidate, obtained from the Military facility Brno, 95 % purity) or paraoxon (*O,O*-diethyl-*O*-(4-nitrophenyl)phosphate, analytical standard 99.2% from Sigma-Aldrich) and distilled water (0.5 ml). The mixture was incubated at 25 °C for 30 minutes to achieve 95% inhibition of AChE. 2.5 ml of solution of sodium chloride (3 M) was added to the mixture with distilled water upto the volume of 23 ml. Finally, 2 ml of solution of acetylcholine iodide (0.02 M) was added. The enzyme activity was measured at pH 8.0 and temperature 25 °C on autotitrator RTS 822 (Radiometer, Denmark). The same procedure was repeated with enzyme further subjected to 10 min incubation with the reactivator.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their appreciation to Mrs. M. Hrabínová for her technical assistance. The work was supported by the grant of Grant Agency of Charles University No. 302/2005/B-CH/FaF and by the grant of Ministry of Defence of Czech Republic No. INTOX OPUOFVZ 200603.

REFERENCES

- Marrs, T. C. *Pharmacol. Ther.*, **1993**, *58*, 51.
- Bajgar, J. *Adv. Clin. Chem.*, **2004**, *38*, 151.
- Marklund, A.; Andersson, B.; Haglund, P. *J. Environ. Monit.*, **2005**, *7*, 814.
- Ringman, J. M.; Cummings, J. L. *Opin. Investig. Drugs*, **1999**, *8*, 463.
- Satoh, T.; Hosokawa, M. *Neurotoxicology*, **2000**, *21*, 223.
- Krivoy, A.; Layish, I.; Rotman, E.; Goldberg, A.; Yehezkeili, Y. *Prehospital Disaster Med.*, **2005**, *20*, 155.
- Kassa, J. *Acta Medica*, **2002**, *45*, 75.
- Petroianu, G. A.; Hasan, M. Y.; Arafat, K.; Nurulain, S. M.; Schmitt, A. *J. Appl. Toxicol.*, **2005**, *25*, 562.
- Rousseaux, C.G.; Gua, A. K. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **1989**, *67*, 1183.
- Kassa, J.; Cabal, J.; Bajgar, J.; Szinicz, L. *ASA Newslett.*, **1997**, *97*, 16.
- Sevelova, L.; Kuca, K.; Krejcová-Kumesová, G. *Toxicology*, **2005**, *207*, 1.
- Kuca, K.; Kassa, J. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2003**, *18*, 529.
- Kuca, K.; Patocka, J. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2004**, *19*, 39.
- Kuca, K.; Jun, D.; Musilek, K. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2006**, *6*, 269.
- Musilek, K.; Lipka, L.; Racakova, V.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. *Chem. Pap.*, **2006**, *60*, 48.
- Musilek, K.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2005**, *20*, 409.
- Musilek, K.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 622.
- Dirks, E.; Scherer, A.; Schmidt, M.; Zimmer, G. *Arzneim. Forsch.*, **1970**, *20*, 55.
- Dirks, E.; Scherer, A.; Schmidt, M.; Zimmer, G. *Arzneim. Forsch.*, **1970**, *20*, 197.
- Reiner, R.; Scherer, A. *Arch. Pharm.*, **1973**, *306*, 424.
- Hagedorn, I.; Stark, I.; Schoene, K.; Schenkel, H. *Arzneim. Forsch.*, **1978**, *28*, 2055.
- Cid, M.H.B.; Holzgrabe, U.; Kostenis, E.; Mohr, K.; Trankle, C. *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 1439.
- Kuca, K.; Cabal, J. *Toxicol. Mech. Method.*, **2005**, *15*, 247.
- Bajgar, J.; Fusek, J.; Kuca, K.; Bartosova, L.; Jun, D. *Mini Rev. Med. Chem.*, in press.
- Patocka, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1977**, *42*, 770.
- Cabal, J.; Kuca, K.; Kassa, J. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2004**, *95*, 81.
- Ekstrom, F.; Akfir, C.; Tunemalm, A. K.; Lundberg, S. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 74.
- Tattersall, J.E. *Br. J. Pharmacol.*, **1993**, *108*, 1006.
- Kim, T.-H.; Kuca, K.; Jun, D.; Jung, Y.-S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 2914.
- Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, F.; Worek, F.; Eyer, P.; Felgenhauer, N.; Zilker, T. *Toxicol. Lett.*, **1999**, *107*, 233.
- Worek, F.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, P. *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, *68*, 2237.
- Kuca, K.; Bielavsky, J.; Cabal, J.; Kassa, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 3545.
- Kuca, K.; Cabal, J.; Patocka, J.; Kassa, J. *Lett. Org. Chem.*, **2004**, *1*, 84.
- Pang, Y.-P.; Kollmeyer, T. M.; Hong, F.; Lee, J.-C.; Hammond, P. I.; Haugabouk, S. P.; Brimijoin, S. *Chem. Biol.*, **2003**, *10*, 491.
- Chennamaneni, S. R.; Vobalaboima, V.; Garlapati, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 3076.
- Chennamaneni, S. R.; Vobalaboima, V.; Garlapati, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 2134.
- Kuca, K.; Patocka, J.; Cabal, J. *J. Appl. Biomed.*, **2003**, *1*, 207.

8 Použitá literatura

- [1] Ringman JM.; Cummings JL. Metrifonate: update on a new antidementia agent. *J. Clin. Psychiatry* **1999**, 60, 776-782.
- [2] Kuča K.; Kassa J. A comparison of the ability of a new bispyridinium oxime 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-carbamoylpyridinium)butane dibromide and currently used oximes to reactivate nerve agent-inhibited rat brain acetylcholinesterase by in vitro methods. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2003**, 18, 529-535.
- [3] Aldridge W. Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenylacetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J.* **1953**, 53, 110-124.
- [4] Massoulie J.; Sussman J.; Bon S.; Silman I. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog. Brain Res.* **1993**, 98, 139-146.
- [5] Main A.; Soucie W.; Buxton I.; Arinc E. The purification of cholinesterase from horse serum. *Biochem. J.* **1974**, 143, 733-744.
- [6] Kutty K.; Payne R. Serum pseudocholinesterase and very low-density lipoproteins metabolism. *J. Clin. Lab. Anal.* **1994**, 8, 247-250.
- [7] Schwarz M.; Glick D.; Loewenstein Y.; Soreq H. Engineering of human cholinesterase explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmacol. Ther.* **1995**, 67, 283-322.
- [8] Balasubramanian A.; Amyloid beta peptide processing, insulin degrading enzyme and butyrylcholinesterase. *Neurochem. Res.* **2001**, 26, 453-456.
- [9] Perry E.; Perry R.; Blessed G.; Tomlinson B. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1978**, 4, 273-277.
- [10] Schneide F.; Steenland K.; Hrenandez B.; Wilson B.; Krieger R.; Spencer J.; margetich S. Monitoring peach harvest workers exposed to azinephosphomethyl residues in Sutter country, California 1991. *Environ. Health Prospect* **1994**, 102, 580-585.
- [11] Ashani Y.; Shapira S.; Levy D.; Wolfe A.; Doctor B.; Raveh L. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase prophylaxis against soman poisoning in mice. *Biochem. Pharamcol.* **1991**, 41, 37-41.
- [12] Barnard, EA. Enzymatic destruction of acetylcholine, In Hubbard JI (ed.): The peripheral nervous system, *Plenum Press: New York*, **1974** st. 201-224.

- [13] Palacios J.; Boddeke H.; Pombo-Vilar E. Cholinergic neuropharmacology: An update. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* **1991**, 366, 27-33.
- [14] Le Novere N.; Corringer P-J.; Changeux J-P. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *Neurobiol.* **2002**, 53, 447-456.
- [15] Brown D. Neurotoxins and ganglionic (C6) type of nicotinic receptor. *Adv. Cytopharmacol.* **1979**, 3, 225-230.
- [16] Court J.; Martin-Ruiz C.; Graham A.; Perry E. Nicotinic receptors in human brain: Topography and pathology. *J.Chem. Neuroanat.* **2000**, 20, 281-298.
- [17] Arias H. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res. Rev.* **1997**, 25, 133-191.
- [18] Patton W.; Zaimis E. The methonium. *Pharmacol. Rev.* **1952**, 4, 219-253.
- [19] Hirota S. A quick guide to muscarinic acetylcholine receptors. *BioPharm. J.* **2001**, 5, 6-8.
- [20] Volpicelli L.; Levey A. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog. Brain Res.* **2004**, 145, 59-66.
- [21] Scarpero H, Dmochowski R. Muscarinic receptors: what we know. *Curr Urol Rep.* **2003**, 4, 421-428.
- [22] Sussman JL.; Harel M.; Frolow F. et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**, 253, 872-879.
- [23] Harel M.; I. Schalk L.; Ehret-Sabatier F. et al. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 9031–9035.
- [24] Berman H.; Leonard K. Ligand exclusion on acetylcholinesterase. *Biochemistry* **1990**, 29, 10640-10649.
- [25] Soreq H.; Gnatt A.; Loewenstein Y.; Seville L. Excursions into the active-site gorge of acetylcholinesterase. *TIBS* **1992**, 17, 353-358.
- [26] Lincová D.; Farghali H. Látky ovlivňující periferní nervový systém. In *Základní a aplikovaná farmakologie. Galén:Praha*, **2005** st. 59-120.
- [27] Changeux J. Responses of acetylcholinesterase from *Torpedo mamorata* to salt and curarizing drugs. *Mol. Pharmacol.* **1996**, 2, 369-392.

- [28] Bajgar J. Nervově paralytické látky. In Patočka et al.: Vojenská toxikologie. *Grada:Praha*, **2005** st. 30-44.
- [29] Antonijevic B.; Stojilkovic M. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *Clin. Med. Res.* **2007**, 1, 71-82.
- [30] Marrs T. Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Therapeut.* **1993**, 58, 51-66.
- [31] Sungur M.; Guven M. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Crit. Care.* **2001**, 5, 211-215.
- [32] Bajgar, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.* **2004**, 38, 151-216.
- [33] Patočka J.; Kuča K.; Jun D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Act. Med. HK.* **2004**, 47, 215-228.
- [34] Wilson I.; Ginsburg S. reaktivation of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphates. *Arch. Biochem. Biophys.* **1955**, 54, 269-271.
- [35] Ekstrom F.; Akfur C.; Tunemalm A.; Lundberg S. Structural changes of phenylalanine 338 and histidine 447 revealed by the crystal structures of tabun-inhibited murine acetylcholinesterase. *Biochemistry* **2006**, 45, 74-81.
- [36] Kamanyire R.; Karalliedde L. Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occup. Med.* **2004**, 54, 69–75.
- [37] Senanayake N.; Karalliedde L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides: an intermediate syndrome. *N. Engl. J. Med.* **1987**, 316, 761–763.
- [38] Johnson MK. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. *Biochem. J.* **1969**, 14, 711–717.
- [39] Lipp JA. Effect of diazepam upon soman-induced seizure activity and convulsions. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **1972**, 32, 557-560.
- [40] Costa E.; Guidotti A. Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1979**, 19, 531-545.
- [41] McDonough J. Jr.; Zoeffel L.; McMonagle J.; Copeland T.; Smith C.; Shih T. Anticonvulsant treatment of nerve agent seizures: anticholinergics versus diazepam in soman-intoxicated guinea pigs. *Epilepsy Res.* **2000**, 38, 1-14.
- [42] Marrs T. Diazepam in the treatment of organophosphorus ester pesticide poisoning. *Toxicol. Rev.* **2003**, 22, 75-81.

- [43] Childs A.; Davies D.; Green A.; Rutland J. The reactivation by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organo-phosphorus compounds. *Br J Pharmacol. Chemother.* **1955**, 10, 462-465.
- [44] Namba T.; Hiraki K. PAM (pyridine-2-aldoxime methiodide) therapy for alkyl-phosphate poisoning. *J. Am. Med. Assoc.* **1958**, 166, 1834-1839.
- [45] Thiermann H.; Szinicz L.; Eyer F.; Worek F.; Eyer P.; Felgenhauer N.; Zilker T. Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning. *Toxicol. Lett.* **1999**, 107, 233-239.
- [46] de Jong L.; Ceulen D. Anticholinesterase activity and rate of decomposition of some phosphorylated oximes. *Biochem. Pharmacol.* **1978**, 27, 857-863.
- [47] Worek F.; Backer M.; Thiermann H.; Szinicz L.; Mast U.; Klimmek R.; Eyer P. Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* **1997**, 16, 466-472.
- [48] Bajgar J.; Fusek J.; Kuča K.; Bartošová L.; Jun D. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2007**, 5, 461-466.
- [49] Cabal J.; Kuča K.; Kassa J. Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, 95, 81-86.
- [50] Worek F.; Thiermann H.; Szinicz L.; Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, 11, 2237-2248.
- [51] Kuča K.; Bielavský J.; Cabal J.; Kassa J. Synthesis of a new reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3545-3547.
- [52] Musílek K.; Kuča K.; Jun D.; Dohnal V.; Doležal M. Synthesis of the novel series of bispyridinium compounds bearing (E)-but-2-ene linker and evaluation of their reactivation activity against chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 622-627.
- [53] Musílek K.; Holas O.; Hambálek J.; Kuča K.; Jun D.; Dohnal V.; Doležal M. Synthesis of bispyridinium compounds bearing propane linker and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxone inhibited AChE. *Lett. org. chem.* **2006**, 3, 831-835.

[54] Musílek K.; Kuča K.; Jun D.; Dohnal V.; Doležal M. Synthesis of a novel series of bispyridinium compounds bearing a xylene linker and evaluation of their reactivation activity against chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2005**, 20, 409-415.