

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	4
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	5
2.1. ACETYLCHOLIN.....	5
2.1.1. <i>Funkce acetylcholinu</i>	5
2.1.2. <i>Syntéza a transport acetylcholinu</i>	5
2.2. CHOLINERGNÍ RECEPTORY	6
2.2.1. <i>Nikotinové receptory</i>	6
2.2.2. <i>Muskarinové receptory</i>	8
2.3. CHOLINESTERASY	10
2.3.1. <i>Butyrylcholinesterasa</i>	10
2.3.2. <i>Acetylcholinesterasa</i>	10
2.4. INHIBITORY ACETYLCHOLINESTERASY	12
2.4.1. <i>Reversibilní inhibitory AChE</i>	12
2.4.2. <i>Ireversibilní inhibitory AChE</i>	14
2.4.3. <i>Mechanismus působení</i>	15
2.4.4. <i>Toxické účinky OFI na organismus, symptomy otravy</i>	16
2.4.5. <i>Pozdní neurologický efekt (PNE)</i>	17
2.4.6. <i>Prevence otravy</i>	18
2.4.7. <i>Terapie otravy</i>	18
2.5. REAKTIVÁTORY AChE	20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1. SYNTETICKÁ ČÁST	22
3.1.1. <i>Obecná syntetická část</i>	22
3.1.2. <i>Příprava monokvarterních reaktivátorů</i>	23
3.2. STANOVENÍ REAKTIVAČNÍCH PARAMETRŮ POTENCIOSTATICKOU METODOU IN VITRO	30
3.2.1. <i>Princip metody</i>	30
3.2.2. <i>Postup měření</i>	32
3.2.3. <i>Výsledky měření in vitro</i>	33
3.3. DISKUSE.....	35
<i>Reaktivace tabunem inhibované AChE</i>	35
<i>Reaktivace paraoxonem inhibované AChE</i>	35
4. ZÁVĚR	36
5. PŘÍLOHY	37
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	38

Seznam zkratek

2-PAM	pralidoxim
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChI	acetylcholin-jodid
AMK	aminokyselina
ASP	asparagová kyselina
ATP	adenosintrifosfát
BChE	butyrylcholinesterasa
BuOH	butanol
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Cys	cystein
CNS	centrální nervový systém
DAG	diacylglycerol
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EA	elementární analýza
GABA	gama-amino máselná kyselina
GDP	guanosindifosfát
Glu	glutamin
HEB	hematoencefalická bariéra
His	histidin
IACHe	inhibitor AChE
IP3	inositoltrifosfát
LGIC	ligand gated ion channel – ligandem řízený iontový kanál
M receptor	muskarinové acetylcholinové receptory
MeCN	acetonitril
M.p.	melting point – teplota tání
nAChR	nikotinové acetylcholinové receptory
NPL	nervově paralytická látka
OP, OFI	organofosfát, organofosfátový inhibitor
Phe	fenylalanin
PLC	fosfolipasa C

PNE	pozdní neurologický syndrom
SD	standard deviation – standardní odchylka
Ser	serin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
Trp	tryptofan
VACht	vesikulární acetylcholinový transportér

1. Úvod a cíl práce

Cholinergní inervace a transmise je v lidském organismu široce rozšířena a řídí velké množství vitálních systémů. Klíčovou úlohu ve správné funkci a v regulaci tohoto systému zastává enzym acetylcholinesterasa (AChE). Ovlivněním aktivity AChE účinkuje celá řada sloučenin. V medicíně se používají sloučeniny modifikující aktivitu AChE k terapii Alzheimerovy choroby, Parkinsonského syndromu nebo myasthenia gravis. Vliv sloučenin na aktivitu AChE má i velký toxikologický význam. Organofosforové inhibitory AChE (OFI) jsou vysoce toxické sloučeniny. Využívají se v zemědělství (pesticidy) a v průmyslu (nehořlavé materiály, hydraulické kapaliny aj.). Podobnou strukturu mají i bojové chemické látky, tzv. nervově paralytické látky (NPL). K ochraně vojáků a lidí pracujících s organofosfáty byla vyvinuta antidota – reaktivátory AChE. Žádný z dostupných reaktivátorů AChE však nepůsobí univerzálně proti všem typům NPL a OFI. Proto je potřeba nalézt vhodnější antidotum.

Cílem této diplomové práce byla příprava 17 nových monokvarterních potenciálních reaktivátorů AChE a *in vitro* testování jejich reaktivačních schopností na tabunem a paraoxonem inhibované AChE. Jako srovnávací látky byly použity komerčně dostupné reaktivátory pralidoxim (2-PAM), azoxim (HI-6), obidoxim, trimedoxim a methoxim.

2. Teoretická část

2.1. Acetylcholin

2.1.1. Funkce acetylcholinu

Acetylcholin je neurotransmiterem pregangliových sympatických a parasympatických nervových vláken, postgangliových parasympatických vláken. Je také mediátorem na neuromuskulární ploténce a má významnou úlohu v mediaci CNS.¹

2.1.2. Syntéza a transport acetylcholinu

Acetylcholin je syntetizován v cytoplazmě presynaptických neuronů z prekurzorů cholinu a acetylkoenzymu A (Acetyl-CoA). Acetyl-CoA vzniká v mitochondriích axonálních zakončení a cholin je do cytoplazmy aktivně přijímán z extracelulárního prostoru. Tato reakce je katalyzovaná enzymem cholinacetyltransferasou.¹

Vzniklý acetylcholin je přepraven do vezikul specifickým transportním mechanismem (vezikulární acetylcholinový transportér - VACHT). Tento protein je složen z 12 transmembránových domén. energii pro přenos acetylcholinu dodává pH gradient. Ten je způsoben činností ATP dependentní protonové pumpy. VACHT zaměňuje molekuly acetylcholinu za protony.

Při přenosu vzruchu napěťově řízené kalciové kanály umožní vstup Ca^{2+} . To stimuluje fúzi vezikul se synaptickou membránou a vylití acetylcholinu spolu s dalšími mediátory do synaptické štěrbiny.

2.2. Cholinergní receptory

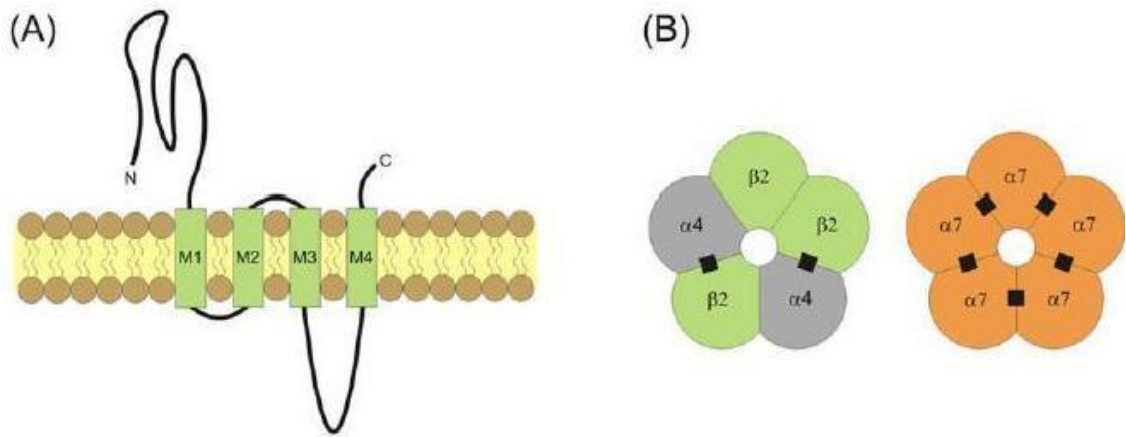
Základní rozdělení těchto receptorů je podle afinity přírodních agonistů nikotinu a muskarinu.

2.2.1. Nikotinové receptory

Tyto receptory jsou ligandem řízené iontové kanály (LGICs). Spolu s GABA_A, GABA_C, 5-HT₃ a glycinovými receptory patří do CYS-loop skupiny. Nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR) se dělí na dva typy – neuronální a muskulární. Neuronální typ je lokalizován především v CNS a ve vegetativních gangliích, muskulární typ zabezpečuje přenos na nervosvalové ploténce. nAChR jsou klíčové v šíření signálu mezi nervovými buňkami v CNS a v gangliích sympatiku. Významně se podílejí na funkci CNS a to zejména vědomí, pozornosti a paměti.²

Každý receptor se skládá z 5 podjednotek obklopujících vodou vyplněný a pro kationty propustný pór. Podjednotek jsou 4 typy, ale jen α podjednotka je schopná vázat ACh. Každá nAChR α podjednotka má dlouhou N-koncovou doménu, na které se nachází místo pro navázání ACh, následují 3 hydrofobní transmembránové regiony (M1 – M3), dlouhá intracelulární smyčka a po ní čtvrtý transmembránový region (M4). Celá struktura je ukončena krátkým extracelulárním C-koncem (Obrázek 1).³

Po navázání zpravidla dvou molekul ACh na podjednotky α dojde ke změně konformace a otevření iontového kanálu. Následný influx kationtů do buňky vyvolá depolarizaci membrány.¹



Obrázek 1: Struktura nikotinových acetylcholinových receptorů⁴

2.2.2. Muskarinové receptory

Muskarinové receptory jsou metabotropní receptory spřažené s G-proteinem. Jsou lokalizovány v CNS i na periférii. V CNS ovlivňují termoregulaci organismu, řízení pohybu nebo paměť. Na periférii se účastní řízení hladké svaloviny, aktivity žláz, kardiovaskulární regulace aj. M receptory jsou i cílem farmakologického ovlivnění nemocí jako jsou Alzheimerova nebo Parkinsonova nemoc, astma, ovlivňují též analgesii, poruchy střevní motility nebo funkci močového měchýře.⁵

M-receptor je tvořen jedním peptidovým řetězcem, který se skládá zhruba z 500 AMK (60kDa). Ve formě α šroubovice $7\times$ prochází buněčnou membránou a jeho smyčky jsou uspořádány do kruhu. Na intracelulárních částech řetězce se nalézají komponenty pro vazbu s G-proteinem. G-protein se skládá ze tří podjednotek, α , β , γ .⁶

Po navázání ligandu na receptor dojde k aktivaci G-proteinu. Odštěpí se α podjednotka a fosforyluje se guanosindifosfát (GDP), který je její součástí. Vzniklá molekula se pohybuje podél membrány, a má schopnost fosforylovat, tedy aktivovat nebo deaktivovat plazmalemárně umístěné efektorové proteiny. Podle typu α podjednotky se určuje afinita k efektorovým proteinům, následný vznik druhých posílů a tedy i účinky receptoru.

Existuje 5 typů M receptorů, M1 –M5. Tyto typy se sdružují do dvou skupin, podle typu G-proteinu navázaného na receptor. M1, M3 a M5 jsou spojeny s $G\alpha_q/11$ nebo $G\alpha_{13}$, jejich kaskáda pokračuje aktivací fosfolipasy C (PLC) a fosfolipasy D (PLD). M2 a M4 jsou převážně spojeny s G_i/G_o , který vede k inhibici adenylátcyklázy.⁷ V následující tabulce je uvedena lokalizace, účinek, agonisté a antagonisté jednotlivých typů M receptorů (Tabulka 1).

Tabulka 1: Lokalizace, účinek, agonisté a antagonisté jednotlivých typů M receptorů

Podtyp	Lokalizace	Funkce	Buň. odpověď Preferovaný G- protein, Druhý posel	Agonisté	Antagonisté
M1	CNS, perif. neurony parietální buňky žaludku	-stimulace CNS (paměť) -↑ sekrece HCl v žaludku -↑ motility GIT	excitace Gq/11 PLC (IP3/DAG) ↑Ca ²⁺ ↓K ⁺	Ach oxotremorin karbachol	pirenzepin atropin mamba toxin ipratropium telenzepin
M2	srdce presynapt. nerv. zakončení	-presynapt. inhibice CNS -útlum srdeční činnosti	inhibice Gi ↓cAMP ↓Ca ²⁺ , ↑K ⁺	Ach methacholin oxotremorin karbachol	atropin oxybutynin tripitamin gallamin
M3	exokrinní žlázy hladké svaly endotel	-sekrece -kontrakce hl. svalů -vazodilatace -akomodace	excitace Gq/11 PLC (IP3/DAG) ↑Ca ²⁺	Ach betanechol karbachol pilocarpin oxotremorin	atropin tolterodin darifenacin ipratropium
M4	žlázy CNS		inhibice Gi ↓cAMP ↓Ca ²⁺ , ↑K ⁺	Ach karbachol oxotremorin	atropin oxybutynin mamba toxin
M5	CNS		excitace Gq/11 PLC	Ach karbachol oxotremorin	atropin ipratropium

2.3. Cholinesterasy

U obratlovců se vyskytují dvě formy cholinesteras – acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BChE).

2.3.1. Butyrylcholinesterasa

BChE je enzym se serin hydrolasovou aktivitou. Nachází se ve většině tkání obratlovců, ale nejvíce se vyskytuje v séru, játrech, stěvě a plicích. BChE je schopná hydrolyzovat širokou škálu sloučenin esterového typu. Další funkcí BChE je ochrana cholinergních drah vychytáváním („scavenging“) xenobiotik, která by je mohla ovlivnit např. OFI nebo inhibitory karbamátového typu.^{8,9}

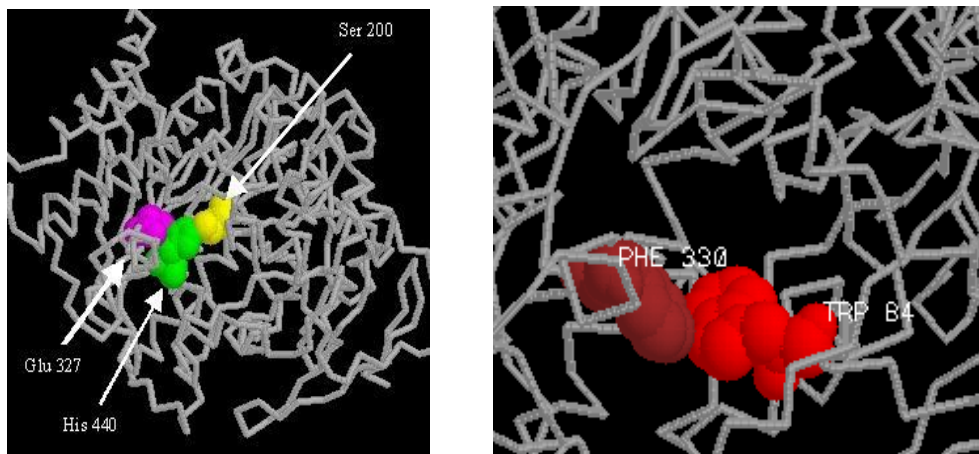
2.3.2. Acetylcholinesterasa

AChE je stejně jako BChE serinová hydrolasa. Je lokalizovaná na postsynaptické membráně cholinergních nervových vláken, v neuromuskulárním spoji, objevuje se i na povrchu erytrocytů. Hlavní funkcí AChE je rychlá hydrolyza neurotransmiteru ACh¹⁰, a tím včasné přerušení, resp. ukončení přenosu signálu. Kontroluje tak přenos signálu a zajišťuje, aby nedošlo k poškození hyperstimulací receptorů. Jakýkoliv zásah do aktivity AChE tedy může mít závažné následky.

Samotný enzym je složen z molekuly s hmotností okolo 60 kDa. Obsahuje 537 aminokyselin, Asp1 na N-konci, a Cys 537 na C-konci. Z důvodů rozmanitosti řetězce se vyskytují hydrofilní i hydrofobní molekuly AChE. V synaptické štěrbině a neuromuskulární ploténce se mnohem častěji vyskytuje hydrofobní varianta. Pomocí disulfidických můstků se jednotlivé molekuly AChE mohou dimerizovat, a pomocí ne vazebných interakcí až tetramerizovat. Výsledný útvar má globulární tvar a pomocí glykofosfatidylinositolu se může vázat na buněčnou membránu.¹¹

Přes strukturální rozdíly v jednotlivých variantách AChE je aktivní místo enzymu totožné. Aktivní místo je umístěno v prohlubni hluboké asi 200 nm. Má dvě

hlavní části – katalytické centrum a anionické centrum. Katalytické centrum je tvořeno katalytickou triádou Ser200, His440 a Glu327 (Obrázek 2). Tyto tři aminokyselinové zbytky zajišťují katalytickou funkci enzymu. Blízko aktivního centra se vyskytuje anionické centrum, tvořené Phe330 a Trp84, kam se váže kvarterní dusík acetylcholinu (Obrázek 2).^{12 13} Nezastupitelnou roli má periferní centrum se zbytkem Trp279. Tato centra jsou důležitá při regulaci aktivity enzymu. Na periferní centrum se mohou vázat allosterické inhibitory, a Trp279 díky své pozici může regulovat přístup k aktivnímu místu enzymu.



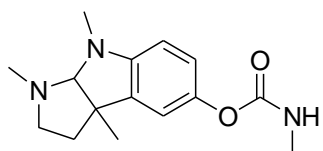
Obrázek 2: Katalytická triáda aktivního místa (vlevo) a anionické centrum (vpravo)^{12 13}

2.4. Inhibitory acetylcholinesterasy

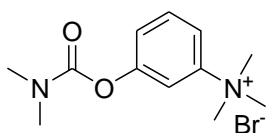
Jsou to sloučeniny, které jsou schopny vazby s AChE. Podle síly vazby, stability vzniklého komplexu a doby potřebné k regeneraci enzymu je dělíme na reversibilní, u kterých obnova enzymu trvá v řádu minut až několika hodin, a ireversibilní, kde obnova enzymu trvá neúměrně dlouho (stovky hodin) nebo neprobíhá vůbec.

2.4.1. Reversibilní inhibitory AChE

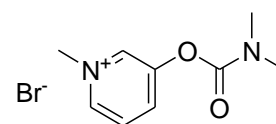
Mezi v medicíně nejpoužívanější patří sloučeniny, které jsou podobné přirozenému substrátu ACh. Obsahují ve své molekule karbamovou kyselinu a kvartérní dusík. Mezi zástupce patří přírodní alkaloid fysostigmin, a jeho syntetické deriváty distigmin, pyridostigmin a neostigmin (Obrázek 3). Kvartérní dusík je důležitý pro navázání na anionické centrum aktivního místa AChE. Při hydrolýze ACh zůstává v aktivním místě enzymu navázán acetyl. Deacetylace a obnovení funkce AChE trvá řádově milisekundy. Při hydrolýze inhibitoru se v aktivním místě naváže substituovaný karbamoyl, jehož odstranění je pomalejší a regenerace AChE je podstatně delší, minuty až hodiny, a dochází tak ke snížení aktivity AChE. Dále sem patří sloučeniny, které fungují jako falešné substráty, ty obsahují vždy jen kvartérní dusík nebo karbamový zbytek (edrofonium-bromid s kvartérním dusíkem a karbaryl s methylkarbamátovým zbytkem). Tyto sloučeniny mají terapeutický a diagnostický význam u chorob jako je glaukom, atonie močového měchýře a střeva, nebo myasthenia gravis.⁶



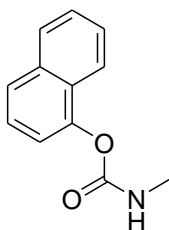
fysostigmin



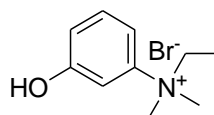
neostigmin



pyridostigmin



karbaryl



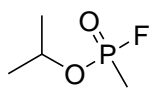
edrofonium-bromid

Obrázek 3: Příklady struktur reversibilních inhibitorů AChE

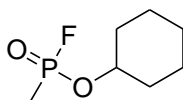
2.4.2. Ireversibilní inhibitory AChE

Chemický základ těchto sloučenin vychází z kys. fosforečné nebo fosfonové, případně z jejich thioanalogů z kys. thiofosforečné a thiofosfonové. Jsou to estery nebo amidy uvedených kyselin. Jeden z hydroxylů může být nahrazen halogenem nebo nitrilovou skupinou. První sloučenina tohoto typu byla syntetizována ve Francii v polovině 19. stol. Původně zamýšlený účel bylo využití v zemědělství. Díky vysoké toxicitě se na ně zaměřil vojenský výzkum a ve třicátých letech 20. stol. bylo objeveno několik sloučenin s vyšší účinností, těkavostí a lipofilitou použitelných jako chemické zbraně, tzv. nervově paralytické látky (sarin, cyklosarin, soman, tabun) a v padesátých letech byly objeveny ještě toxicitější sloučeniny (VX, VG). Tyto zbraně naštěstí nebyly nikdy masově použity s výjimkou genocidy kurdských osad na severu Iráku v osmdesátých letech 20. století a teroristických útoků v devadesátých letech v Japonsku, ve městě Matsumoto nebo v Tokijském metru.¹⁴

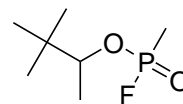
Organofosforové sloučeniny stále slouží svému původnímu účelu – používají se i nadále jako pesticidy. Jsou preferovány kvůli své nízké ceně (chlorpyrifos, paraoxon, parathion). Rozšířily se i do dalších odvětví lidské činnosti, používají se v průmyslu jako hydraulické kapaliny, zpomalovače hoření, nehořlavé suroviny nebo změkčovadla.¹⁵



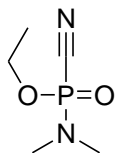
sarin



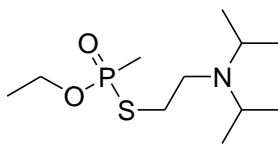
cyclosarin



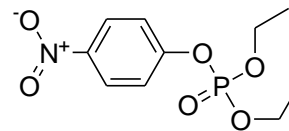
soman



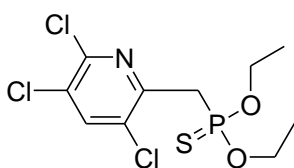
tabun



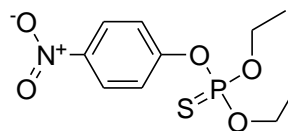
VX



paraoxon



chlorpyrifos



parathion

Obrázek 4: Příklady struktur bojových chemických látek a pesticidů

2.4.3. Mechanismus působení

OFI se do organismu dostávají různými branami vstupu, obvykle jsou to dýchací cesty, trávicí trakt při pozření nebo transdermální cesta při zasažení pokožky. Za nejzávažnější se kvůli vysoké těkavosti považuje vstup dýchacími cestami. Následuje transport krevním řečištěm, při kterém se ochrannými mechanismy eliminuje velká část OFI – vychytávání scavengery, oxidace a konjugace s glukuronovou kyselinou¹⁶. Oxidace nezpůsobuje pouze deaktivaci, ale v případě thio-OFI způsobuje zvýšení toxicity.

Vlastní mechanismus působení inhibitoru na AChE se skládá ze tří základních reakcí. První je reakce s hydroxyskupinou v aktivním místě AChE, kde proběhne fosforylace, resp. fosforylace (Schéma 1)

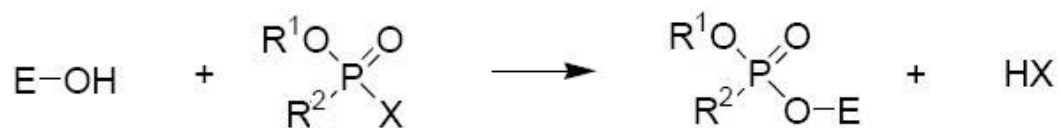


Schéma 1: Fosforylace hydroxyly aktivního centra

Dále následuje hydrolýza vzniklého komplexu. Touto reakcí se AChE regeneruje a je schopná nadále plnit svoji činnost. Vzniklý komplex je ale natolik stabilní, že tato reakce probíhá ve velice omezeném rozsahu.



Schéma 2: Hydrolýza komplexu enzym-inhibitor

Vedle spontánní regenerace enzymu probíhá paralelně ještě „aging“ AChE – stárnutí AChE. Tento děj ireverzibilně poškodí AChE. Enzym postížený stárnutím nemůže být reaktivován. Při této reakci na zbytku OFI proběhne dealkylace a deaminace, a celá molekula se stabilizuje interakcí s His440 z katalytické triády¹⁷. Jednotliví zástupci NPL se liší kinetikou stárnutí, nejrychleji probíhá u somanu (řádově minuty), u dalších inhibitorů je poločas reakce řádově desítky minut až hodiny.¹⁸



Schéma 3: Stárnutí inhibovaného enzymu

2.4.4. Toxické účinky OFI na organismus, symptomy otravy

Klinické symptomy otravy OFI insekticidy a NPL jsou způsobeny nahromaděním acetylcholinu a následnou dlouhodobou stimulací receptorů. První fáze

otravy je tedy akutní cholinergní krize. Symptomy lze rozdělit na tři skupiny – muskarinové, nikotinové a centrální.

Muskarinové účinky v sobě zahrnují efekt ACh na žlázy, takže dochází ke zvýšené sekreci. Nejmarkantnější je zvýšené pocení, slzení, slinění a zvýšená sekrece na nosní a bronchiální sliznici. Mezi další muskarinové účinky patří působení na hladké svaly a na srdce. Dochází k poruše akomodace, mióze, ke křečím v břišní krajině, průjmu, samovolné mikci a bradykardii.

Nikotinové účinky zahrnují efekt ACh na autonomní ganglia a příčně pruhované svaly. Dochází k aktivaci sympatiku, takže se může dostavit bledost, tachykardie, hypertenze, třes a fascikulace.

Centrální účinky jsou nejzávažnější a bývají příčinou úmrtí zasaženého organismu – útlum dechového centra a ovlivnění kardiovaskulárního centra. Dále hyperstimulace v CNS může způsobit strnulost, úzkostné stavy, neklid, bolesti hlavy, třes, zmatenost a nevolnost.^{19, 20}

Smrt organismu při letální dávce je způsobena paralýzou dýchání, a to útlumem dechového centra a paralýzou dýchacích svalů.

Pokud organismus přežije akutní cholinergní krizi, v horizontu 1 – 4 dní se může objevit takzvaný „intermediate syndrome“. Jedná se o paralýzu proximálních částí končetin. Pokud jsou zasaženy i dýchací svaly, je nutné zavést řízenou ventilaci. Tento stav nereaguje ani na podání atropinu, ani na léčbu reaktivátorem AChE.

2.4.5. Pozdní neurologický efekt (PNE)

Pozdní neurologický efekt (PNE) se manifestuje několik dnů až týdnů po expozici OFI. Způsobují ho jen některé OFI, jejichž hlavním reprezentantem je tri-*o*-kresylfosfát. Tento stav je charakterizován motorickými a senzorickými poruchami, degenerací a demyelinizací periferních nervů, inhibicí a později dealkylací tzv. neurotoxické esterase.¹⁵ Vyskytuje se i po expozici OFI, která nebyla klinicky

diagnostikována. Po týdenním až měsíčním období latence může nastat fáze cholinergního dráždění, charakteristického zvýšenou sekrecí v horních cestách dýchacích, laryngitidou, faryngitidou a zvýšeným slzením. Dále se vyskytují bolesti až paralýza končetin. Charakteristickým znakem jsou bolesti až křeče v lýtkách. PNE dále progreduje proximálně se šířící paralýzou volních pohybů bez postižení senzitivní inervace. Po 1 – 2 měsících následuje stádium denervace, po kterém se vyvíjí těžká atrofie svalů. Může následovat částečná reparace, ale doba rekonvalescence je v horizontu roku.²¹

2.4.6. Prevence otravy

Základní způsob ochrany proti NPL je zamezení jejich průniku do organismu. To se provádí „prostředky individuální ochrany“, které zahrnují ochranou masku, chránící oči, obličej a hlavně dýchací cesty před zasažením. Zbytek těla je chráněn ochranným oblekem. Při zasažení se používá látka s vysokou adsorpční schopností Desprach[®]. NPL se adsorbuje na jeho vnitřní povrch a zabrání jeho průniku do organismu.

Existuje i farmakologická profylaxe. Používá se k ní reversibilní inhibitor AChE pyridostigmin. Ten ochrání AChE před účinky NPL převážně na periferiích. Dále se používá benaktyzin a trihexyfenidyl. Tyto sloučeniny mají anticholinergní účinky a pronikají HEb. Zabraňují centrálním účinkům otravy NPL a snižují výskyt nežádoucích účinků terapie pyridostigminem.²²

2.4.7. Terapie otravy

Terapie otravy organofosforovými inhibitory acetylcholinestery v sobě zahrnuje tři přístupy: antikonvulzivně sedativní, symptomatickou a kauzální terapii.

Jako antikonvulzivum a sedativum se v terapii užívají benzodiazepiny, nejčastěji diazepam (10 mg i. m.), uvažuje se i o použití alprazolamu nebo klonazepamu. Antikonvulzivní terapie má zabránit účinkům OFI v CNS, které vedou k tonicko-klonickým generalizovaným křečím a následnému poškození některých oddílů CNS.¹⁵

Symptomatická terapie brání dlouhodobé nadměrné stimulaci cholinergních receptorů pomocí anticholinergní sloučeniny – atropinu. Tolerance organismu zasaženého NPL k atropinu je tak vysoká, že předávkování prakticky nejde dosáhnout. Proto se pokračuje v titrování dávky až k prvním příznakům (mydriáza, zčervenání pokožky). Při závažném zasažení NPL se mohou použít další (benaktyzin, biperiden, skopolamin).¹⁹

Kauzální terapie spočívá v podání reaktivátoru acetylcholinesterasy.

2.5. Reaktivátory AChE

Jsou to sloučeniny, které mají schopnost reaktivovat – obnovit funkci AChE. Mají ve své molekule nukleofilní skupinu, která je schopná rozštěpit vazbu mezi navázaným OFI zbytkem a enzymem.

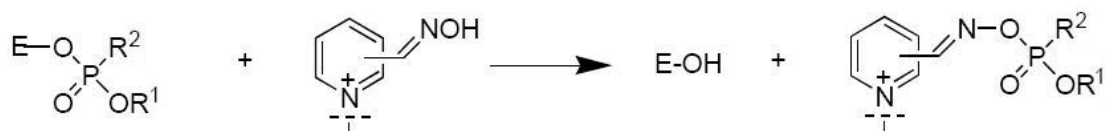
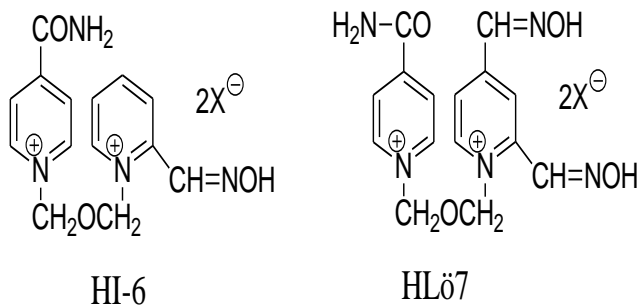
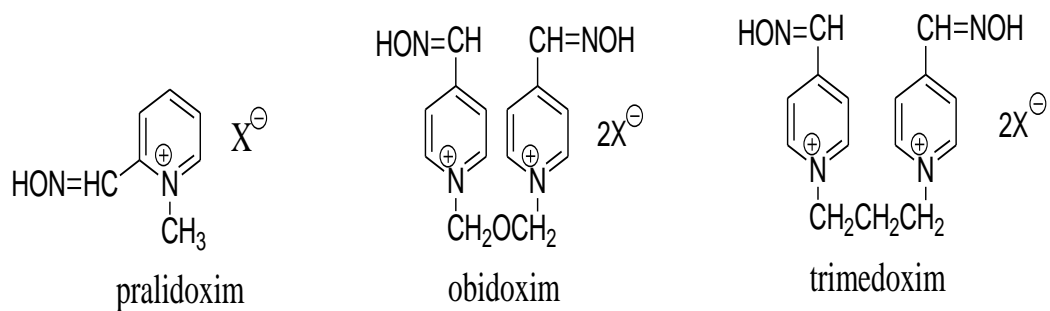


Schéma 4: Reaktivace inhibované AChE a vznik komplexu reaktivátor-inhibitor

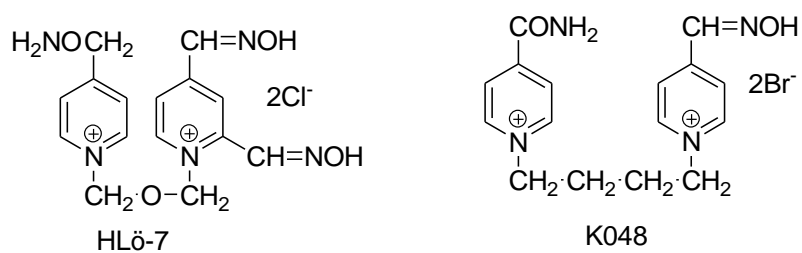
Jako nejvýhodnější nukleofil se ukázala oximová skupina. Dále ve své molekule reaktivátor obsahuje jeden nebo dva kvarterní dusíky, podle toho, zda se jedná o mono nebo biskvarterní sloučeninu. V případě biskvarterní sloučeniny je ještě přítomen spojovací řetězec. Všechny tyto strukturní znaky ovlivňují afinitu reaktivátoru k enzymu a tak jeho účinnost. Prvním použitým reaktivátorem byl pralidoxim (**1**, 2-PAM), který i dnes patří mezi nepoužívanější antidota. Mezi další užívané sloučeniny patří azoxim (**2**, HI-6), obidoxim (**3**), trimedoxim (**4**) a methoxim (**5**) – Obrázek 5. Další sloučeniny jsou ve vývoji (HIö-7, K048) – Obrázek 6.

Z dosavadního výzkumu se ukázalo, že vyšší účinnosti dosahují sloučeniny biskvarterní, s polohou oximové skupiny v poloze 2 (HI-6) nebo 4 (obidoxim, trimedoxim) základního pyridiniového kruhu.

Schopnost reaktivace je závislá na použitém inhibitoru. Zatím neexistuje reaktivátor, který by byl schopen dostatečně a hlavně univerzálně léčit otravu různými OFI. Dosavadní výzkum reaktivátorů byl zaměřen především pro vojenské účely, proto účinnost dostupných sloučenin proti OF pesticidům nedosahuje dostatečné úrovně.



Obrázek 5: Příklady struktur užívaných reaktivátorů.



Obrázek 6: Příklady struktur reaktivátorů ve vývoji

3. Experimentální část

3.1. Syntetická část

3.1.1. Obecná syntetická část

Rozpouštědla (aceton, DMF, MeCN) a chemikálie byly dodány od firem Fluka a Sigma-Aldrich a použity bez dalšího čištění. Reakce byly monitorovány pomocí TLC (DC-Alufolien Cellulose F, Merck, Německo) s použitím soustavy BuOH-CH₃COOH-H₂O 5:1:2 a detekovány Dragendorfovým 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 HPLC/MS Agilent Technologies (Waldbronn, Německo). Skládá se z vakuového zplynovače G1322A, kvartrní 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. HPLC separace nebyla prováděna, byla přímo zaznamenána hmotnostní spektra analyticky čistých produktů. 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 DC a průtok 13 l/min.

3.1.2. Příprava monokvarterních reaktivátorů

4-hydroxyiminomethylpyridin (1,0 g; 8,188 mmol) byl rozpuštěn v 10 ml acetonu (**15 – 17**) nebo acetonitrilu (**6 – 14, 18 – 23**) a byl přidán alkyhalogenid (8,188 mmol). Směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla (Tabulka 2) a poté ochlazena na cca $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Surový produkt byl odfiltrován za sníženého tlaku a rekrystalován z MeCN (Schéma 5).

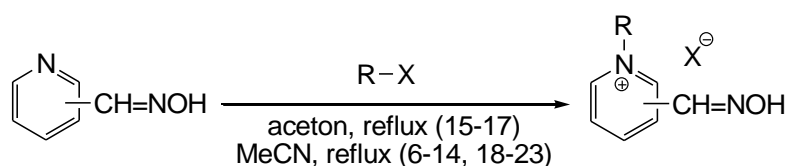


Schéma 5: Příprava monokvarterního reaktivátoru

Tabulka 2: Reaktanty, polohové izomery hydroxyiminomethylpyridinu, reakční časy a výtěžky reakcí

Sloučenina	R	X	Pozice oximové skupiny	Trvání reakce (hod)	výtěžek (%)
6	CH_3-	I	2- $\text{CH}=\text{NOH}$	6.5	69
7	CH_3-	I	3- $\text{CH}=\text{NOH}$	6.5	94
8	CH_3-	I	4- $\text{CH}=\text{NOH}$	6.5	83
9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2-$	Br	2- $\text{CH}=\text{NOH}$	16	10
10	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2-$	Br	3- $\text{CH}=\text{NOH}$	8	45
11	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2-$	Br	4- $\text{CH}=\text{NOH}$	6.5	7
12	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$	Br	2- $\text{CH}=\text{NOH}$	10	70
13	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$	Br	3- $\text{CH}=\text{NOH}$	9	90
14	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$	Br	4- $\text{CH}=\text{NOH}$	8	77
15	benzyl	Br	2- $\text{CH}=\text{NOH}$	14	56

16	benzyl	Br	3-CH=NOH	7.5	43
17	benzyl	Br	4-CH=NOH	7	61
18	2-fenylethyl	Br	2-CH=NOH	10	6
19	2-fenylethyl	Br	3-CH=NOH	10	72
20	2-fenylethyl	Br	4-CH=NOH	9	66
21	3-fenylpropyl	Br	2-CH=NOH	48	8
22	3-fenylpropyl	Br	3-CH=NOH	10	83
23	3-fenylpropyl	Br	4-CH=NOH	9	86

(6) 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium-jodid: R_f 0,37. M. p. 233 – 236 °C. ^1H NMR, ^{13}C NMR a ESI-MS spektra jsou shodná s údaji v literatuře.²³ EA: vypočteno 31,84 % C, 3,44 % H, 10,61 % N; nalezeno 31,97 % C, 3,49 % H, 10,78 % N.

(7) 3-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium-jodid: R_f 0,36. M. p. 133 – 137 °C. ^1H NMR, ^{13}C NMR and ESI-MS spektra jsou shodná s údaji v literatuře.²³ EA: vypočteno 31,84 % C, 3,44 % H, 10,61 % N; nalezeno 31,24 % C, 3,61 % H, 10,76 % N.

(8) 4-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium-jodid: R_f 0,41. M. p. 178 – 181 °C. ^1H NMR, ^{13}C NMR and ESI-MS spektra jsou shodná s údaji v literatuře.²³ EA: vypočteno 31,84 % C, 3,44 % H, 10,61 % N; nalezeno 31,89 % C, 3,41 % H, 10,59 % N.

(9) 2-hydroxyiminomethyl-1-propylpyridinium-bromid: R_f 0,56. M. p. 184 – 190 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ 9,07 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-6), 8,81 (s, 1H, -CH=NOH), 8,61 – 8,53 (m, 1H, H-5), 8,41 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-3), 8,16 – 8,07 (m, 1H, H-4), 4,71 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N-CH₂-), 1,90 – 1,73 (m, 2H, -CH₂-CH₃), 0,92 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, -CH₂-CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 146,70, 145,83, 145,11, 141,42, 127,35, 125,75, 59,01, 23,74, 10,16. EA: vypočteno 44,10 % C, 5,35 % H, 11,43 % N; nalezeno 44,51 % C, 5,37 % H, 11,60 % N. ESI-MS: m/z 165,0 [M]⁺ (vypočteno pro [C₉H₁₃N₂O]⁺ 165,10).

(10) 3-hydroxyiminomethyl-1-propylpyridinium-bromid: R_f 0,53. M. p. 193 – 196 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ 9,28 (s, 1H, H-2), 9,07 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-6), 8,73 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-4), 8,35 (s, 1H, -CH=NOH), 8,22 – 8,14 (m, 1H, H-5), 4,60 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N-CH₂-), 2,04 – 1,87 (m, 2H, -CH₂-CH₃), 0,89 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, -CH₂-CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 144,26, 143,20, 142,38, 141,32, 133,32, 128,01, 62,25, 23,94, 10,14. EA: vypočteno 44,1 % C, 5,35 % H, 11,43 % N; nalezeno 44,01 % C, 4,97 % H, 11,79 % N. ESI-MS: m/z 165,0 [M]⁺ (vypočteno pro [C₉H₁₃N₂O]⁺ 165,10).

(11) 4-hydroxyiminomethyl-1-propylpyridinium-bromid: R_f 0,57. M.p. 135 – 137 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ 9,04 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-2,6), 8,44 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 8,24 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-3,5), 4,54 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N- CH_2 -), 2,00–1,85 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 0,88 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 150,05, 146,54, 123,96, 120,50, 61,53, 23,95, 10,15. EA: vypočteno 44,10 % C, 5,35 % H, 11,43 % N; nalezeno 44,31 % C, 4,73 %H, 11,59 % N. ESI-MS: m/z 165,0 $[\text{M}-\text{H}^+]^+$ (vypočteno pro $[\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}]^+$ 165,10).

(12) 1-allyl-2-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,43. M.p. 185 – 188 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ 9,11 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-6), 8,67 (s, 1H, $\text{CH}=\text{NOH}$), 8,65 – 8,57 (m, 1H, H-5), 8,44 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-3), 6,20 – 6,04 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,50 (d, 2H, $J = 5,0$ Hz, N- CH_2 -), 5,38 (d, 1H, $J = 10,5$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,12 (d, 1H, $J = 17,0$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}_2$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 147,04, 145,98, 145,62, 141,39, 131,72, 127,70, 125,54, 119,67, 59,47. EA: vypočteno 44,47 % C, 4,56 % H, 11,52 % N; nalezeno 43,68 % C, 4,72 %H, 11,44 % N. ESI-MS: m/z 163,1 $[\text{M}]^+$ (vypočteno pro $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}]^+$ 163,09).

(13) 1-allyl-3-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,44. M.p. 163 – 165 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ 9,29 (s, 1H, H-2), 9,07 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-6), 8,77 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-4), 8,39 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 8,25 – 8,17 (m, 1H, H-5), 6,27 – 6,11 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,53 – 5,41 (m, 2H, N- CH_2 -), 5,35 (d, 2H, $J = 6,15$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 144,33, 143,19, 142,28, 141,77, 133,43, 131,40, 128,19, 122,20, 62,50. EA: vypočteno 44,47 % C, 4,56 % H, 11,52 % N; nalezeno 44,54 % C, 4,81 % H, 11,80 % N. ESI-MS: m/z 163,1 $[\text{M}]^+$ (vypočteno pro $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}]^+$ 163,09).

(14) 1-allyl-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,49. M.p. 189 – 190 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ 9,05 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, H-2,6), 8,46 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 8,27 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, H-3,5), 6,28 – 6,03 (m, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$ -), 5,53 – 5,19 (m, 4H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$ -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 148,57, 145,01, 144,94, 131,59, 124,07, 121,77, 61,72. EA: vypočteno 44,47 % C, 4,56 % H, 11,52 %

N; nalezeno 44,22 % C, 4,81 % H, 11,76 % N. ESI-MS: m/z 163,1 [M]⁺ (vypočteno pro [C₉H₁₁N₂O]⁺ 163,09).

(15) 1-benzyl-2-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,66. M.p. 217 – 219 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ 9,29 (d, 1H, J = 6,0 Hz, H-6), 8,75 (s, 1H, -CH=NOH), 8,70 – 8,60 (m, 1H, H-5), 8,43 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H 3), 8,26 – 8,17 (m, 1H, H-4), 7,48 – 7,33 (m, 3H, Ph), 7,31–7,21 (m, 2H, Ph), 6,15 (s, 2H, -CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ 147,09, 146,37, 145,88, 141,36, 133,83, 129,12, 128,79, 127,82, 127,21, 126,00, 60,21. EA: vypočteno 53,26 % C, 4,47 % H, 9,56 % N; nalezeno 53,07 % C, 4,51% H, 9,69 % N. ESI-MS: m/z 213,1 [M]⁺ (vypočteno pro [C₁₃H₁₃N₂O]⁺ 213,10).

(16) 1-benzyl-3-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,67. M.p. 170 – 173 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ 9,46 (s, 1H, H-2), 9,24 (d, 1H, J = 6,0 Hz, H-6), 8,75 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H-4), 8,38 (s, 1H, -CH=NOH), 8,25 – 8,16 (m, 1H, H-5), 7,65 – 7,55 (m, 2H, Ph), 7,50 – 7,38 (m, 3H, Ph), 5,94 (s, 2H, -CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ 144,34, 143,19, 142,21, 141,91, 133,96, 133,68, 129,33, 129,12, 128,87, 128,43, 63,28. EA: vypočteno 53,26 % C, 4,47 % H, 9,56 % N; nalezeno 53,22 % C, 4,50 % H, 9,67 % N. ESI-MS: m/z 213,1 [M]⁺ (vypočteno pro [C₁₃H₁₃N₂O]⁺ 213,10).

(17) 1-benzyl-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,71. M.p. 191 – 193 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ 9,20 (d, 2H, J = 6,0 Hz, H-2,6), 8,43 (s, 1H, -CH=NOH), 8,26 (d, 2H, J = 6,0 Hz, H-3,5), 7,61 – 7,51 (m, 2H, Ph), 7,50 – 7,38 (m, 3H, Ph), 5,88 (s, 2H, -CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ 148,69, 145,01, 144,94, 134,22, 129,25, 129,13, 128,74, 124,32, 62,58. EA: vypočteno 53,26 % C, 4,47 % H, 9,56 % N; nalezeno 52,70 % C, 4,86 % H, 9,21 % N. ESI-MS: m/z 213,1 [M]⁺ (vypočteno pro [C₁₃H₁₃N₂O]⁺ 213,10).

(18) 1-(2-fenylethyl)-2-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,66. M.p. 164 – 166 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ 8,90 (d, 1H, J = 6,0 Hz, H-6), 8,73 (s, 1H, -

CH=NOH), 8,59 – 8,48 (m, 1H, H-5), 8,36 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-3), 8,10 – 7,96 (m, 1H, H-4), 7,39 – 7,10 (m, 5H, Ph), 5,04 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N- CH_2 -), 3,17 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, Ph- CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 146,82, 145,95, 145,28, 141,37, 135,69, 128,91, 128,52, 127,12, 125,82, 58,46. EA: vypočteno 54,74 % C, 4,92 % H, 9,12 % N; nalezeno 54,14 % C, 4,98 % H, 9,21 % N. ESI-MS: m/z 227,1 $[M]^+$ (vypočteno pro $[C_{14}H_{15}N_2O]^+$ 227,12).

(19) 1-(2-fenylethyl)-3-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,63. M.p. 215 – 216°C. 1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ 9,30 (s, 1H, H-2), 9,04 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-6), 8,71 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-4), 8,32 (s, 1H, -*CH=NOH*), 8,17–8,09 (m, 1H, H-5), 7,35–7,20 (m, 5H, Ph), 4,91 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N- CH_2 -), 3,30 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, Ph- CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 144,28, 143,11, 142,39, 141,55, 136,00, 133,16, 128,84, 128,53, 127,83, 127,00, 61,62, 36,26. EA: vypočteno 54,74 % C, 4,92 % H, 9,12 % N; nalezeno 55,30 % C, 5,19 % H, 9,44 % N. ESI-MS: m/z 227,1 $[M]^+$ (vypočteno pro $[C_{14}H_{15}N_2O]^+$ 227,12).

(20) 1-(2-fenylethyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,67. M.p. 220 – 222°C. 1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ 9,03 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-2,6), 8,42 (s, 1H, -*CH=NOH*), 8,20 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-3,5), 7,34 – 7,20 (m, 5H, Ph), 4,86 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N- CH_2 -), 3,27 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, Ph- CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 148,33, 144,98, 144,90, 136,05, 128,82, 128,53, 126,98, 123,74, 60,88, 36,28. EA: vypočteno 54,74 % C, 4,92 % H, 9,12 % N; nalezeno 54,71 % C, 5,19 % H, 9,33 % N. ESI-MS: m/z 227,1 $[M]^+$ (vypočteno pro $[C_{14}H_{15}N_2O]^+$ 227,12).

(21) 1-(3-fenylpropyl)-2-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,73. M.p. 129 – 131°C. 1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ 9,10 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, H-6), 8,76 (s, 1H, -*CH=NOH*), 8,59 – 8,50 (m, 1H, H-5), 8,38 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-3), 8,13 – 8,04 (m, 1H, H-4), 7,33 – 7,15 (m, 5H, Ph), 4,78 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N- CH_2 -), 2,71 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N- CH_2-CH_2 -), 2,20 – 2,04 (m, 2H, Ph- CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 146,76, 145,92, 145,08, 141,39, 140,27, 128,35, 128,11, 127,37, 126,07, 125,73, 57,59, 31,77, 31,35. EA: vypočteno 56,09 % C, 5,33 % H, 8,72 % N; nalezeno 55,84 % C, 5,43 % H, 8,83 % N. ESI-MS: m/z 241,1 $[M]^+$ (vypočteno pro $[C_{15}H_{17}N_2O]^+$ 241,13).

(22) 1-(3-fenylpropyl)-3-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,71. M.p. 143 – 145 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ 9,33 (s, 1H, H-2), 9,13 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, H-6), 8,72 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-4), 8,35 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 8,19 – 8,11 (m, 1H, H-5), 7,32 – 7,13 (m, 5H, Ph), 4,71 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N- CH_2 -), 2,67 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N- CH_2 - CH_2 -), 2,37 – 2,21 (m, 2H, Ph- CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 144,37, 143,18, 142,60, 141,18, 140,21, 133,28, 128,30, 128,13, 127,96, 126,02, 60,79, 31,82, 31,49. EA: vypočteno 56,09 % C, 5,33 % H, 8,72 % N; nalezeno 54,52 % C, 4,98 % H, 8,52 % N. ESI-MS: m/z 241,1 $[\text{M}]^+$ (vypočteno pro $[\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}]^+$ 241,13).

(23) 1-(3-fenylpropyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid: R_f 0,73. M.p. 161 – 163 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ 9,10 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, H-2,6), 8,45 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 8,22 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, H-3,5), 7,32 – 7,12 (m, 5H, Ph), 4,65 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N- CH_2 -), 2,66 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, N- CH_2 - CH_2 -), 2,33 – 2,17 (m, 2H, Ph- CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ 148,22, 145,00, 144,95, 140,22, 128,32, 128,14, 126,01, 123,90, 60,02, 31,88, 31,47. EA: vypočteno 56,09 % C, 5,33 % H, 8,72 % N; nalezeno 56,66 % C, 5,94 % H, 9,04 % N. ESI-MS: m/z 241,1 $[\text{M}]^+$ (vypočteno pro $[\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}]^+$ 241,13).

3.2. STANOVENÍ REAKTIVAČNÍCH PARAMETRŮ POTENCIOSTATICKOU METODOU IN VITRO

3.2.1. Princip metody

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

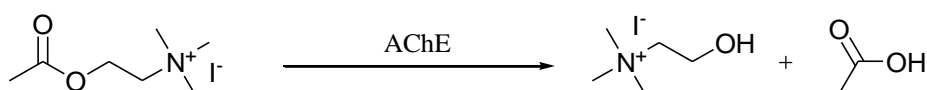


Schéma 6: Enzymatická přeměna acetylcholinu.

Při reakci AChE s OFI dochází k ireverzibilní inhibici AChE (Schéma 7).

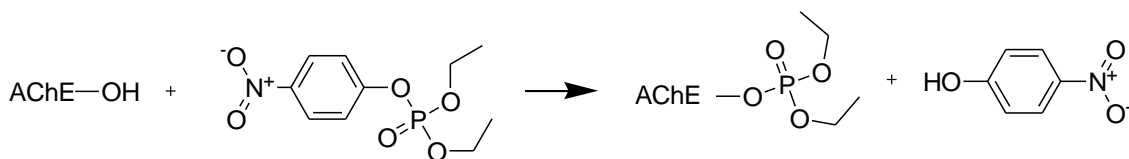


Schéma 7: Ireverzibilní inhibice acetylcholinesterasy paraoxonem.

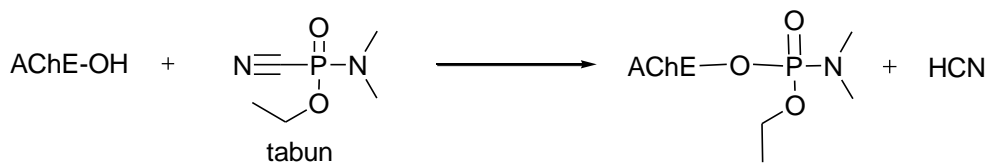


Schéma 8: 3 Ireverzibilní inhibice acetylcholinesterasy tabunem.

Reakcí inhibované AChE s oximátovým anionem dochází k reaktivaci enzymu (Schéma 9 a 10).

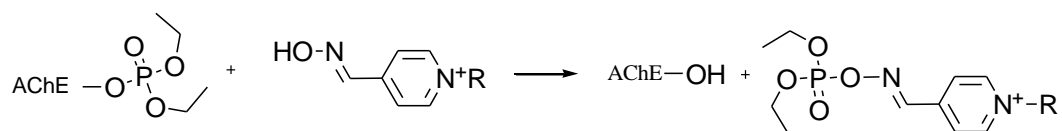


Schéma 9: Reaktivace acetylcholinesterasy inhibované paraoxonem.

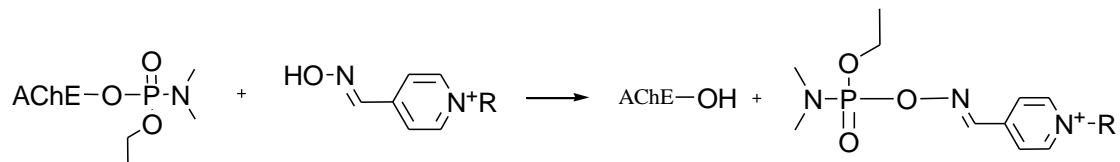


Schéma 10: Reaktivace acetylcholinesterasy inhibované tabunem.

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).

3.2.2. 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 M; 2,5 ml) a destilované vody (18,5 ml), zkumavka byla vypláchnuta destilovanou vodou (1 ml). Nakonec byl přidán roztok acetylcholinjodidu (0,02 M; 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 M) na čase.

V případě reaktivace inhibované AChE byla směs inkubována dalších 10 minut s roztokem reaktivátoru (10^{-3} M nebo 10^{-5} M; 0,2 ml) a destilovanou vodou (0,8 ml). Poté byla inkubovaná směs přelita do roztoku chloridu sodného (3 M; 2,5 ml) a destilované vody (17,5 ml), zkumavka byla vypláchnuta destilovanou vodou (1 ml). Byl přidán roztok acetylcholinjodidu (0,02 M; 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:

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

3.2.3. Výsledky měření *in vitro*

Všechny reaktivátory AChE byly testovány *in vitro* při dvou koncentracích (10^{-3} M nebo 10^{-5} M). Jako OFI byla zvolena NPL tabun a pesticid paraoxon. Jako srovnávací reaktivátory byly zvoleny sloučeniny pralidoxim (1), HI-6 (2), obidoxim (3), trimedoxim (4) a methoxim (5). Průměrné výsledky dvou na sobě nezávislých *in vitro* měření pro každý reaktivátor jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 3: Výsledky reaktivace testovaných sloučenin v % (průměrná hodnota dvou měření).

Inhibitor	Reaktivace ± SD (%)			
	tabun		paraoxon	
	Reaktivátor/koncentrace	10 ⁻³ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻³ M
pralidoxim (1)	4 ± 1	0	42 ± 1	0
HI-6 (2)	2 ± 1	4 ± 1	35 ± 2	0
obidoxim (3)	11 ± 0	0	76 ± 2	37 ± 2
trimedoxim (4)	30 ± 0	0	46 ± 1	50 ± 4
methoxim (5)	0	0	71 ± 3	0
6	4 ± 1	0	42 ± 1	0
7	0	0	1 ± 0	0
8	1 ± 0	1 ± 0	16 ± 0	3 ± 1
9	6 ± 1	0	52 ± 1	0
10	1 ± 0	1 ± 0	0	0
11	0	0	22 ± 0	0
12	9 ± 1	0	38 ± 0	0
13	1 ± 0	0	0	0
14	3 ± 0	0	12 ± 0	0
15	6 ± 0	0	0	0
16	0	2 ± 0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	4 ± 0	16 ± 0	9 ± 0
19	0	0	7 ± 1	3 ± 0
20	4 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	0
21	1 ± 0	2 ± 0	20 ± 1	5 ± 1
22	0	4 ± 0	0	4 ± 2
23	0	2 ± 0	7 ± 2	4 ± 1

3.3. Diskuse

V současné době existuje jen omezené množství informací o vztahu struktury a účinnosti reaktivátorů AChE. Dosud známé údaje byly přehledně zpracovány v předcházející diplomové práci.²⁴

Cílem mé diplomové práce bylo připravit monokvarterní reaktivátory AChE substituované na pyridinovém dusíku methylem, propylem, allylem, benzylem, 2-fenylethylem nebo 3-fenylpropylem. V každé sérii byly vždy připraveny všechny polohové izomery, tj. 2-hydroxyiminomethyl-, 3-hydroxyiminomethyl- a 4-hydroxyiminomethyl-derivát. U připravených sloučenin byla hodnocena reaktivační účinnost proti tabunem a paraoxonem inhibované AChE. Dosažené výsledky je možno shrnout takto:

Reaktivace tabunem inhibované AChE

Pro další testování reaktivátorů je potřeba, aby při předběžném testování překročila reaktivační schopnost 10 %. Pralidoxim, HI-6 a methoxim nejsou vhodné k terapii otravy tabunem. Obidoxim a trimedoxim jsou nejsilnější komerčně dostupné sloučeniny k léčbě otravy tabunem. Z nově nasyntetizovaných reaktivátorů se k hranici reaktivace 10 % přiblížila pouze látka **12** při koncentraci 10^{-3} M. V lidské plazmě však lze dosáhnout pouze koncentrace 10^{-4} M, proto ani sloučenina **12** není vhodná k dalšímu testování.

Reaktivace paraoxonem inhibované AChE

U AChE inhibované paraoxonem je z komerčně dostupných reaktivátorů nejvhodnější trimedoxim s reaktivací okolo 50 % při koncentraci 10^{-5} M. Při koncentraci 10^{-3} M vykazovalo několik sloučenin slibné hodnoty reaktivace (**6**, **9**, **12**), i když nedosahovaly účinnosti biskvarterních reaktivátorů. Ale při koncentracích dosažitelných v plazmě (10^{-5} M) byla reaktivační schopnost rapidně snížena nebo úplně vymizela.

Podrobněji jsou dosažené výsledky diskutovány v publikaci – viz Příloha 1²⁵.

4. Závěr

Ve své diplomové práci jsem se zabýval přípravou a biologickým hodnocením monokvarterních pyridiniových reaktivátorů AChE.

Celkem bylo připraveno 18 sloučenin, z toho 17 nových, v literatuře dosud nepopsaných derivátů.

Žádná z připravených sloučenin nevykázala dostatečnou reaktivační účinnost vůči tabunem ani vůči paraoxonem inhibované AChE.

Výsledky této diplomové práce budou publikovány v časopise *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.²⁵



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



Monoquaternary pyridinium salts with modified side chain—synthesis and evaluation on model of tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase

Kamil Musilek^{a,b,*}, Jiri Kucera^b, Daniel Jun^{a,c}, Vlastimil Dohnal^d, Veronika Opletalova^b, Kamil Kuca^{a,c}

^a Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Tebeska 1575, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic

^b Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heymsova 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^c Center of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, Tebeska 1575, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2008

Revised 8 July 2008

Accepted 16 July 2008

Available online xxx

Keywords:

Acetylcholinesterase

Tabun

Paraoxon

Reactivator

Oxime

Monoquaternary

ABSTRACT

Acetylcholinesterase reactivators are crucial antidotes for the treatment of organophosphate intoxication. Eighteen monoquaternary reactivators of acetylcholinesterase with modified side chain were developed in an effort to extend the properties of pralidoxime. The known reactivators (pralidoxime, HI-6, obidoxime, trimedoxime, methoxime) and the prepared compounds were tested in vitro on a model of tabun- and paraoxon-inhibited AChE. Monoquaternary reactivators were not able to exceed the best known compounds for tabun poisoning, but some of them did show reactivation better or comparable with pralidoxime for paraoxon poisoning. However, extensive differences were found by a SAR study for various side chains on the non-oxime part of the reactivator molecule.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

An enzyme acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7; AChE) plays the essential role in the human neuronal system degrading neurotransmitter acetylcholine within a synaptic cleft. There are many natural or artificial compounds that are able to inhibit AChE activity.¹ The competitive (reversible) AChE inhibitors are used for various purposes such as treatment of Alzheimer's disease or Myasthenia gravis.² On the other hand, the irreversible AChE inhibitors such as organophosphate inhibitors (OPI) belong to the most dangerous compounds. The OPI, including pesticides (e.g., parathion, paraoxon, diazinon), nerve agents (e.g., tabun, soman, sarin, VX) or industrial compounds (e.g., tributylphosphate, tri-*n*-cresylphosphate), covalently bind on the AChE active site (Ser200; wild-type *Torpedo californica*) and block its activity (Fig. 1).^{3,4} Consequently, the acetylcholine cannot be degraded and it permanently stimulates the cholinergic receptors. The muscarinic (e.g., lacrimation, salivation, miosis) or nicotinic symptoms (e.g., muscle spasms) occur and the organism is endangered by failure of breath centre in central nervous system and subsequent death from suffocation.⁴

The treatment of OPI intoxication usually consists in prophylaxis, symptomatic and causal medication. The persons working

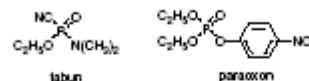


Figure 1. Examples of the organophosphorus acetylcholinesterase inhibitors.

or handling with OPI (e.g., farmers, soldiers) may be pre-treated with reversible AChE inhibitors (e.g., pyridostigmine) to block the OPI binding, with other esterases (e.g., butyrylcholinesterase) to scavenge the OPI or with oxime (e.g., HI-6) to reactivate OPI-AChE complex.⁴ The symptomatic treatment counteracts the symptoms of intoxication using parasympatholytics such as atropine. The main causal treatment is focused on splitting the covalent bond between the AChE and OPI moiety.⁵ The AChE reactivators such as pralidoxime (1; 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium chloride), oxime HI-6 (2; 1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-carbamoylpyridinium)-2-oxapropane dichloride) obidoxime (3; Tazogonine[®], 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropane dichloride), trimedoxime (4; 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-propane dibromide) or methoxime (5; 1,1-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-methane dichloride) are used in advantage of nucleophilic hydroxyiminomethyl (oxime) functional group, which is able to cleave the OPI moiety from the active site and restore AChE activity (Fig. 2).^{6–8} Unfortunately, there is no sin-

* Corresponding author. Tel.: +420 973 251 523; fax: +420 495 518 084. E-mail address: musilek@pmfick.cz (K. Musilek).

6. Seznam použité literatury

-
- ¹ Lincová, D. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, Praha 2002, s. 98 – 100.
- ² Liu, X. et al.: Mechanics of channel gating of the nicotinic acetylcholine receptor. *PLoS Comput. Biol.* **2008**, *4*, 100 – 110
- ³ McKay, B. E. et al.: Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *78*, 1120 – 1133.
- ⁴ Rand, J. B.: *Acetylcholine*. In: Wormbook [online] © The C. elegans Research Community 2007 [cit. 2008-08-18]. Dostupné z doi/10.1895/wormbook.1.131.1 nebo http://www.wormbook.org/chapters/www_acetylcholine/acetylcholine.html.
- ⁵ Malcolm P. et al.: Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 279 – 290.
- ⁶ Lüllman, H. et al.: *Farmakologie a toxikologie*. Grada Publishing, Praha 2004, s. 22.
- ⁷ Kim, D. R. et al.: Calcium mobilization by activation of M(3)/M(5) muscarinic receptors in the human retinoblastoma. *J. Pharmacol. Sci.* **2007**, *105*, 184 – 192.
- ⁸ Giacobini, E. et al.: *Butyrylcholinesterase – Its Function and Inhibitors*. 11th Ed. Martin Dunitz (Taylor Francis Group), London and New York, 2003, s. 1 – 226.
- ⁹ Li, H. et al.: Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. *Biochem. J.* **2008**, *411*, 425 – 432.
- ¹⁰ Kuča, K. et al.: Reactivators of tabun-inhibited acetylcholinesterase: structure-biological activity relationship. *Front. Drug Des. Discov.* **2007**, *3*, 381 – 394.
- ¹¹ Massoulie J.: The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* **2002**, *11*, 130 – 143.
- ¹² Harel, M. et al.: Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 9031 – 9035.
- ¹³ Sussman, J. L. et al.: Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**, *23*, 872 – 878.
- ¹⁴ Okumura, T. et al.: The Tokyo subway sarin attack: disaster management, Part 1: community emergency response. *Acad. Emerg. Med.* **1998**, *5*, 613 – 617.
- ¹⁵ Patočka, J. et al.: *Vojenská toxikologie*. Grada Publishing, Praha 2004, s. 30 – 44.

-
- ¹⁶ Jokanović, M.: Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* **2001**, *166*, 139 – 160.
- ¹⁷ Millard, C. B. et al: Crystal structure of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7032 – 7039.
- ¹⁸ Patočka, J. et al.: Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *J. Appl. Biomed.* **2005**, *3*, 91 – 99.
- ¹⁹ Marrs, T. C.: Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.* **1993**, *58*, 51 – 65.
- ²⁰ Laine, P. et al. Mechanism of pulmonary edema induced by an organophosphorus compound. *Fund. Appl. Toxicol.* **1991**, 177 – 185.
- ²¹ Slotkin, T. et al.: Ameliorating the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: mechanism-based approach in PC12 cells. *Environ. Health Perspect.* **2007**, *115*, 1306 – 1309.
- ²² Albuquerque, E. et al.: Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *35*, 13220 – 13225.
- ²³ Srinivas Rao, C. et al.: Quaternary salts of 4,3' and 4,4' bis-pyridinium monooximes. Part 2: Synthesis and biological activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2134 – 2138.
- ²⁴ Holas O.; Vztah mezi strukturou a účinností potenciálních reaktivátorů acetylcholinesterasy I. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2008, 48 s.
- ²⁵ Musilek, K. et al.: Monoquaternary pyridinium salts with modified side chain – synthesis and evaluation on model of tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Ch.* **2008**, doi:10.1016/j.bmc.2008.07.036