

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organickej a bioorganickej chémie

DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Syntéza nových reaktivátorov
acetylcholínesterázy izochinolínového typu**

Hradec Králové 2017

Miroslava Hozová

„Týmto prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím autorským dielom. Všetka literatúra a zdroje použité v tejto práci sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú citované. Tato práca nebola použitá k získaniu rovnakého alebo iného titulu.“

V Hradci Králové 7.9.2017

Miroslava Hozová

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie v prvom rade patrí Centru biomedicínskeho výzkumu Fakultnej nemocnice v Hradci Králové za možnosť spolupráce, konkrétne RNDr. Dávidovi Maliňákovi Ph.D. za ochotu, vedenie a trpezlivosť, ktorú vynaložil v rámci mojej diplomovej práce.

Ďalej chcem pod'akovať doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za nameranie NMR spektier, Mgr. et Mgr. Rafaelovi Doležlovi, Ph.D. za HRMS analýzu a školiteľovi PharmDr. Jaroslavovi Rohovi, Ph.D. za ochotu a ústretivosť.

ABSTRAKT:

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Kandidát: Miroslava Hozová

Školiteľ: PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Dávid Maliňák, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Syntéza nových reaktivátorov acetylcholinesterázy
izochinolínového typu

Organofosfáty sú celosvetovo najčastejšiou príčinou otráv či už v oblasti poľnohospodárstva, pokusov o samovraždy, náhodným kontaktom alebo zneužitím ako bojových plynov. Môžu byť absorbované všetkými cestami – inhalačne, enterálne alebo transdermálne. Jediné používané kauzálne antidotá – reaktivátory acetylcholinesterázy sú na trhu už vyše 50 rokov. Biologická dostupnosť je však nedostatočná, terapia málo účinná a stále neexistuje širokospektrálne liečivo účinné pri intoxikácii rôznymi organofosfátmi.

Doposiaľ existujúce používané reaktivátory majú štruktúru monokvartérnych alebo biskvartérnych pyridíniových solí. Ide o látky pralidoxim, metoxim, trimedoxim, obidoxim, HI-6 a HI-7. Podmienkou účinku je prítomnosť funkčnej oximovej skupiny (R-CH=NOH), ktorá je schopná vyviazať organofosfát z väzby s enzýmom a tak obnoviť jeho funkciu.

V diplomovej práci sme sa zamerali na syntézu, určenie štruktúry a fyzikálno-chemických vlastností analógov pyridíniových oximov. Ide o štruktúry monokvartérnej izochinolínovej soli, biskvartérnych izochinolínových solí s reťazcom C₃-C₁₂, biskvartérnych izochinolínovo-izonikotínoamidových solí s reťazcom C₃-C₅ a biskvartérnej izochinolínovej soli s oxapropylovým reťazcom, ktoré predpokladáme, že môžu byť potenciálnymi novými reaktivátormi acetylcholinesterázy.

ABSTRACT:

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Student: Miroslava Hozová

Supervisor: PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Consultant: RNDr. Dávid Maliňák, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Synthesis of novel acetylcholinesterase reactivators of isoquinolinic type

Organophosphates are worldwide the most common cause of poisoning, whether in the field of agriculture, attempted suicide, accidental contact or abuse as organophosphorus nerve agents. They can be absorbed by all paths - inhaled, ingest or by transdermal penetration. For over 50 years the only causal antidotes on the market have been acetylcholinesterase reactivators. However, bioavailability is inadequate, therapy is ineffective, and there is no broad-spectrum reactivator able to efficiently restore AChE activity after intoxication by different types of organophosphates.

All available reactivators are charged oximes with one or two pyridinium rings. These are pralidoxime, methoxime, trimedoxime, obidoxime, HI-6 and HIö-7. Effective structure require functional oxime group ($R-CH = NOH$) which is able to bind the organophosphate agent from enzyme and restore its function.

In this thesis, we focused on preparation, identifying structure and specifying physical and chemical properties of new analogues to pyridinium oximes. These structures are monoquaternary isoquinoline salt, C₃-C₁₂ bis-quaternary isoquinoline salts, C₃-C₅ bis-quaternary isoquinoline-isonicotinamide salts and the bis-quaternary isoquinoline salt with oxapropyl chain. These compounds are supposed to be potential new reactive acetylcholinesterase.

OBSAH

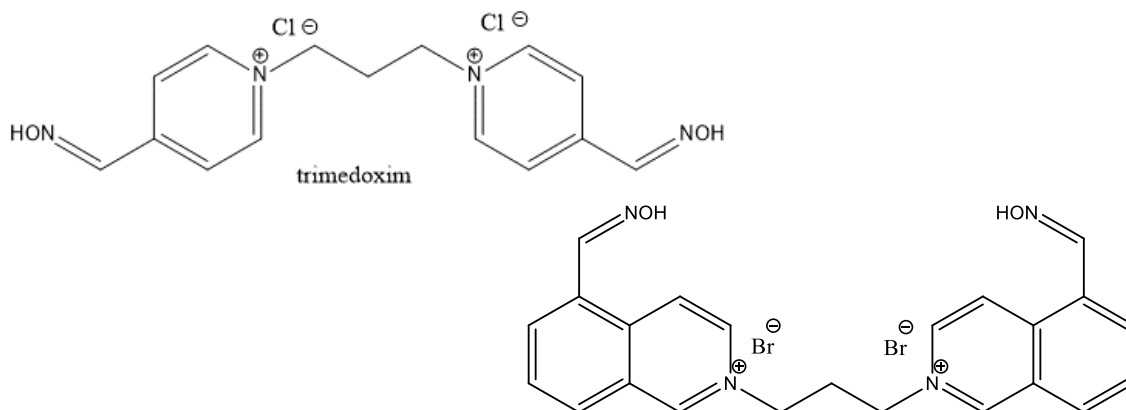
Katedra organickej a bioorganickej chémie.....	- 1 -
PodĎakovanie	- 3 -
ABSTRAKT	- 4 -
ABSTRACT.....	- 5 -
OBSAH	- 6 -
1. ÚVOD A CIEĽ DIPLOMOVEJ PRÁCE	- 8 -
2. TEORETICKÁ ČASŤ	- 9 -
2.1. Acetylcholín a jeho úloha v tele	- 9 -
2.1.1. Receptory parasympatika	- 9 -
2.2. Cholinesterázy	- 10 -
2.2.1. Štruktúra a mechanizmus účinku.....	- 11 -
2.2.2. Inhibítory acetylcholinesterázy	- 12 -
2.3. Organofosfáty	- 13 -
2.3.1. Štruktúra	- 14 -
2.3.2. Mechanizmus pôsobenia	- 15 -
2.3.3. Toxicita.....	- 15 -
2.3.4. Otrava organofosfátmi.....	- 18 -
2.3.5. Terapia.....	- 20 -
2.4. Reaktivátory AChE.....	- 20 -
2.4.1. Farmakokinetika	- 23 -
2.4.2. Účinnosť	- 23 -
3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	- 25 -
3.1. Príprava izochinolín-5-oximu (východisková látka) (2).....	- 26 -
3.2. Príprava monokvartérnej soli.....	- 28 -
3.3. Príprava biskvartérnych izochinolínových solí.....	- 30 -

3.4. Príprava biskvartérnych izochinolínovo-izonikotínamidových solí	- 41 -
3.5. Príprava biskvartérnej izochinolínovej soli s oxapropylovým reťacom	- 45 -
4. DISKUSIA A VÝSLEDKY	- 47 -
5. ZÁVER	- 50 -
6. ZOZNAM OBRÁZKOV A SCHÉM	- 53 -
7. ZOZNAM TABULIEK	- 54 -
8. ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK	- 55 -
9. POUŽITÁ LITERATÚRA	- 57 -

1. ÚVOD A CIEĽ DIPLOMOVEJ PRÁCE

Organofosfáty sú podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) zodpovedné za viac ako jeden milión vážnych, neúmyselných otráv a za vyše dva milióny pokusov o samovraždu použitím insekticídov. Tieto prípady sa objavujú celosvetovo každý rok a z nich priemerne 200 000 prípadov podľahne otrave. (Bajgar 2004) Naviac, štruktúru organofosfátov majú aj látky, ktoré sú zneužívané ako bojové plyny. Ide o vysoko lipofilné látky absorbované všetkými cestami – inhalačne, enterálne alebo transdermálne. Ireverzibilne blokujú enzým acetylcholinesterázu, čo vedie ku kumulácii acetylcholínu na synapsiách. Prejavom otravy je nadmerná stimulácia parasympatického nervového systému, ktorá končí paralýzou dýchacích svalov a následnou smrťou, ktorá môže nastať v prípade bojových plynov aj za niekoľko hodín. Súčasná štandardná liečba reaktivátormi acetylcholinesterázy zahŕňa rôzne typy oximov monokvartérnych alebo biskvartérnych pyridíniových solí. Medzi najpoužívanejšie patria pralidoxim, metoxim, trimedoxim, obidoxim, HI-6 a HI-7. Pre úspešnú reaktiváciu je nevyhnutné aby molekula spĺňala tri podmienky. Prvou podmienkou je silná nukleofilita daná prítomnosťou oximovej funkčnej skupiny, ktorá je zodpovedná za obnovu enzýmu. Druhou podmienkou je správna orientácia ku komplexu enzým-organofosfát a poslednou je zabránenie procesu starnutia tohoto komplexu. (Gorecki 2016) Účinnosť týchto látok je nízka. V dôsledku ich nukleofility sú v organizme ionizované a teda prechádzajú cez biologické bariéry len obmedzene. Navyše neexistuje univerzálne antidotum pri otrave rôznymi organofosfátmi.

V diplomovej práci sme sa preto zamerali na syntézu nových štruktúr oximových reaktivátorov izochinolínového typu (Obr. 1) a určili sme ich fyzikálno-chemické vlastnosti.

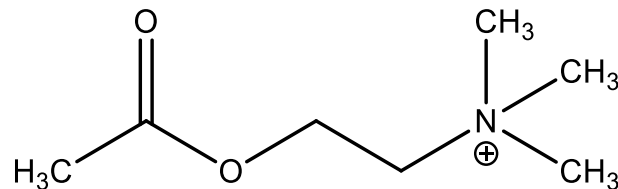


Obr.1. Štruktúry trimedoximu a izochinolínového analógu

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Acetylcholín a jeho úloha v tele

Acetylcholín (ACh) - ester kyseliny octovej a cholínu je neurotransmitter v mnohých orgánoch inervovaných autonómnym nervovým systémom na synapsiách centrálného nervového systému a taktiež na neuromuskulárnej platničke (Obr. 2). Má prevažne inhibičné účinky sprostredkované nikotínovými alebo muskarínovými receptormi. V centrálnej nervovej sústave je široko distribuovaný, hlavne v prednom mozgu a mozgovom kmeni a pôsobí tu excitačne. Podstatný je cholinergný výbežok nucleus basalis do neokortexu frontálneho laloku mozgu spojeného s lymbickým systémom, ktorého poškodenie je spájané s Alzheimerovou chorobou. Acetylcholín je syntetizovaný v presynaptickom zakončení neurónu enzýmom acetylcholintransferázou z cholínu a acetyl-CoA. Pri prenose nervového vzruchu je uvoľňovaný do synaptickej štrbiny a viaže sa na postsynaptické receptory. Štiepi sa enzýmom acetylcholinesterázou alebo pseudocholinesterázou, taktiež lokalizovanou postsynapticky, na cholín, ktorý je späť vychytávaný a kyselinu octovú a tým je ukončený jeho účinok. (Martínková 2007)



Obr. 2. Štruktúra acetylcholínu

2.1.1. Receptory parasympatika

Parasympatický nervový systém disponuje dvoma typmi cholinergných receptorov. Nikotínové N-receptory sa delia na N_m receptory nervovosvalovej platničky a N_n receptory vegetatívnych ganglií. Líšia sa iba v stavbe, vo funkcii sú identické. Ide o iónové kanály v bunkovej membráne, ktoré sa po naviazaní dvoch molekúl Ach otvoria a dochádza k prestupu Na^+ a Ca^{2+} iónov na druhú stranu membrány a teda

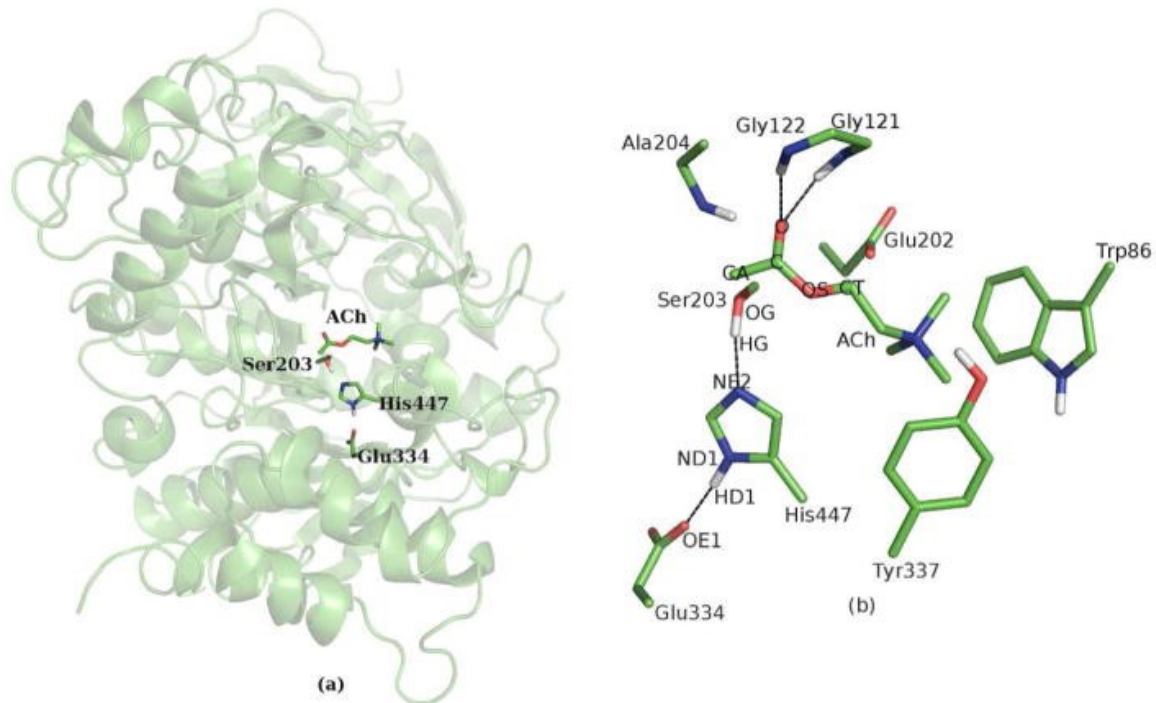
k depolarizácii. Ak je depolarizácia dostatočne silná, je vyvolaný akčný potenciál umožňujúci šírenie nervového vzruchu.

Muskarínové M-receptory patria ku skupine G-proteín viažucich receptorov. Delia sa na podtyp M_1 až M_5 . M_1 sa vyskytujú v mozgu a vegetatívnych gangliách, M_2 v srdci, M_3 v hladkom svalstve, najmä v tráviacej sústave. Funkcia receptorov M_4 a M_5 je zatiaľ málo objasnená. Pri všetkých, okrem M_2 receptora, vyvoláva väzba acetylcholínu prostredníctvom proteínu G_q aktiváciu fosfolipázy $C\beta$ (PLC β). Fosfolipáza štiepi fosfatidilinozitol-4,5-bifosfát (PIP $_2$ alebo PIP $_2$, fosfolipid) na inozitoltrifosfát (IP $_3$) a diacylglycerol (DAG). IP $_3$ spôsobí uvoľnenie vápnika z endoplazmatického retikula, ktorý vyvolá buď neskorý excitujúci potenciál alebo v prípade M_3 receptora kontrakciu hladkého svalu. M_2 receptory sú spojené s inhibičným G_i proteínom. Tento v sinoatriálnom a átrioventrikulárnom uzle srdca otvorí vybrané draslíkové kanály. Dôsledkom je negatívny chronotropný a dromotropný účinok. Výsledkom pôsobenia acetylcholínu v nervovom systéme je teda spomalenie srdcovej činnosti, v pľúcach zvyšuje sekréciu a vyvoláva bronchokonstrikciu, v tráviacej sústave zvyšuje peristaltiku a podporuje tráviace procesy. Celkovo v organizme vedie ku anabolickému efektu. (Mladěnka 2015, Schmidt 2004)

2.2. Cholinesterázy

Cholinesterázy sú skupina enzýmov katalyzujúcich rozklad neurotransmiteru acetylcholínu na cholín a kyselinu octovú – reakciu potrebnú na návrat cholinergného neurónu do pokojovej fázy následne po aktivácii. Cholinesterázy môžeme rozdeliť na dva typy: Acetylcholinesterázu (AChE, acetylcholín acetylhydroláza) môžeme nájsť v rôznych typoch vodivých tkanív: v nervoch a svaloch, centrálnom aj periférnom nervovom systéme, motorických a senzorických vláknach, v cholinergných aj necholinergných vláknach a tiež ju môžeme nájsť na membráne červených krviniek, kde predstavuje antigénu krvnú skupinu Yt (Obr. 3). Aktivita AChE je vyššia v motorických ako senzorických neurónoch. Tento enzým existuje v niekoľkých molekulových formách, ktoré sa vyznačujú rovnakými katalytickými vlastnosťami ale líšia sa ich oligométnym zostavením a spôsobom prichytenia na povrch bunky. V mozgu cicavcov má hlavné zastúpenie tetramér AChE vo forme G4 a v menšom zastúpení monométna G1 (4S) forma. Druhým typom je pseudocholinesteráza (BuChE) alebo

taktiež známa ako plazmová cholinesteráza, butyrylcholinesteráza alebo acylcholin acylhydroláza. Vzniká v ribozómoch pečeneých buniek a je vylučovaná do krvi. (Čolović 2013, Sussman 1991)



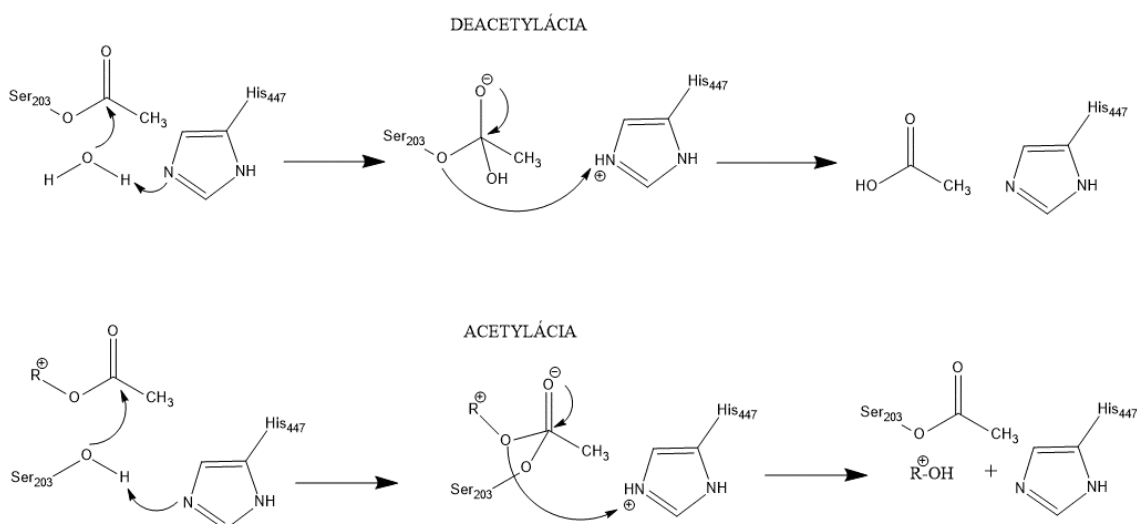
Obr. 3. Štruktúra acetylcholinesterázy (Zhou 2010)

2.2.1. Štruktúra a mechanizmus účinku

Acetylcholinesteráza je serín - hydrolázový vysokoúčinný enzým katalyzujúci hydrolýzu acetylcholínu rýchlosťou reakcie blízkou difúziou – kontrolovaného limitu. (Zhou 2010) Hlavnou úlohou enzýmu je ukončenie neurotransmisie cholinergných neurónov rýchlou hydrolýzou acetylcholínu. AChE má pozoruhodne vysokú špecifitu katalytickej aktivity – každá molekula AChE degraduje okolo 25 000 molekúl acetylcholínu za sekundu. (Taylor 1994)

Monomér AChE má molekulovú hmotnosť okolo 60000. (Sussman 1991) Molekula má elipsoidnú štruktúru s rozmermi 45Å na 60Å na 65Å. Monomér enzýmu je α/β proteín pozostávajúci z 12 zapletených centrálnych β -skladaných listov obklopených 14 α -helix štruktúrami. Najpodstatnejšou časťou je hlboké úzke hrdlo – 20Å dlhé, prenikajúce polovicou enzýmu a rozširujúce sa v základe. Aktívne miesto sa nachádza

4Å od spodnej časti molekuly a zahrňuje dve miesta: anionické miesto a esterové miesto zodpovedajúce za katalytickú aktivitu, respektíve za väzbu acetylcholínu. Anionické miesto viaže pozitívne nabitý kvartérny amóniový kation cholínu, ako aj ostatné kvartérne ligandy kompetitívnych inhibítorov a tiež kvartérne oximy, ktoré reaktivujú inhibovanú AChE. (Čolović 2013) Aktívne miesto obsahuje katalytickú triádu (postranné reťazce Ser²⁰³, His⁴⁴⁷ a Glu³³⁴), peptidické NH skupiny Gly¹²¹, Gly¹²² a Ala²⁰⁴ (oxyaniónové miesto) a ďalšie aniónové miesto, ktoré je tvorené bočnými reťazcami Glu²⁰², Trp⁸⁶ a Tyr³³⁷. (Zhou 2010) Hydrolýza esteru karboxylu iniciovaná Ser²⁰³ vedie k vytvoreniu acyl-enzýmu a voľného cholínu (Obr. 4). Následne acyl-enzým podstúpi nukleofilný atak molekulou vody, sprostredkovaný aj skupinou His⁴⁴⁰ uvoľňujúc kyselinu octovú za súčasnej regenerácie enzýmu. (Nachmansohn 2009)



Obr. 4. Štiepenie acetylcholínu enzýmom acetylcholinesterázou

2.2.2. Inhibítory acetylcholinesterázy

Inhibítory acetylcholinesterázy, resp. cholinesteráz, blokujú túto skupinu enzýmov a bránia tak rozkladu acetylcholínu, čo má za následok zvýšenú koncentráciu acetylcholínu na synapsiách a taktiež predĺženie jeho účinku. Na základe mechanizmu účinku môžeme rozdeliť AChE inhibítory do dvoch skupín: reverzibilné a ireverzibilné.

Reverzibilné inhibítory, s kompetitívnou ale aj nekompetitívnou inhibíciou, sú používané ako liečivá Alzheimerovej choroby, Myasthenie gravis alebo ako antidotá

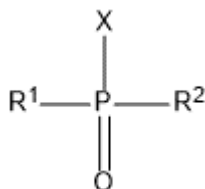
anticholinergik. Najčastejšie používanými sú donepezil, galantamín a karbamáty.

Karbamáty sú niekedy označované ako pseudoreverzibilné inhibítory, keďže k spontánnej hydrolýze väzby enzým-inhibítora dochádza v ráde hodín. Ide o deriváty karbámovej kyseliny (NH_2COOH) s mechanizmom účinku rovnakým ako u organofosfátov. V prírode sa vyskytujúci karbamát – fyzostigmín z materskej rastliny *Physostigma venenosum* bol predlohou štruktúrou pre syntetické zlúčeniny, napr. pyridostigmín alebo rivastigmín, používané v terapii dodnes. Pri použití organofosfátových inhibítora je hydroxyl aktívneho miesta blokovaný zbytkom kyseliny fosforečnej alebo fosfónovej. Výsledný komplex enzým-inhibítora sa hydrolyzuje veľmi pomaly (stovky hodín) a navyše podlieha starnutiu, kedy sa väzba stáva ešte pevnejšia a teda má ireverzibilný charakter. (Čolović 2013, Doležal 2011)

2.3. Organofosfáty

Organofosfáty sú skupina organických zlúčenín – esterov alebo tiolov kyselín fosforečnej, fosfónovej, fosfinovej alebo amidofosforečnej, pre ktoré je charakteristická vysoká lipofilita a predovšetkým schopnosť ireverzibilne inhibovať acetylcholinesterázu (AChE). Organofosfáty (OP) sa vďaka lipofilnému charakteru absorbujú veľmi rýchlo, môžu sa vstrebávať transdermálne i cez neporušenú kožu, byť vdýchnuté alebo použité perorálne. Koncentrujú sa v nervovom tkanive, kde sa nachádza miesto ich toxického účinku – ako substrátových analógov acetylcholínu. Tak ako acetylcholín viažu sa na aktívne miesto teda – OH skupinu serínu. Na rozdiel od acetylovaného enzýmu, ktorý veľmi rýchlo obnoví funkciu odštiepením kyseliny octovej, fosforylovaný enzým je stabilný. Inhibovaný enzým sa môže spontánne reaktivovať – rýchlosť závisí od inhibítora. Reaktivácia AChE inhibovanej organofosfátmi s rozvetvenými alkylmi prebieha najpomalšie. Preto je akútna toxicita závislá od štruktúry inhibítora, rýchlosti spontánnej reaktívácie a rýchlosti procesu „starnutia“ (aging) enzýmu. „Starnutie“ enzýmu je však v prípade OP také rýchle, že spontánna reaktivácia pred úplnou stratou enzymovej aktivity je zanedbateľná a po ňom už nie je možné dosiahnuť disociácie väzby ani po podaní antidota. (Jokanović 2009, Šepsová 2011) Preto obnova funkcie AChE je závislá len na pomalej syntéze enzýmu de novo. Intoxikácia látkami blokujúcimi AChE vedie ku kumulácii acetylcholínu v synaptickej štrbine. Výsledkom je otrava

s príznakmi, ktoré zodpovedajú zosilnenému fyziologickému účinku acetylcholínu, ako sú nadmerná salivácia a potenie, únik moču a stolice, svalové fascikulácie až paralýza, zmätenosť, ataxia, strata reflexov až kóma. Smrť pri akútnej intoxikácii nastáva následkom bronchospasmu a paralýzy dýchacieho svalstva. (Pope 2005)



Obr. 5. Všeobecný vzorec organofosfátov

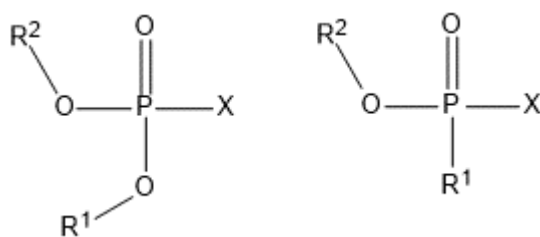
2.3.1. Štruktúra

Organofosfáty pozostávajú z časti podobnej acetylcholínu tvorenej rozvetveným uhl'ovodíkovým reťazcom zvyčajne nesúcim kladný náboj (ako acetylcholín – kvartérna amóniová báza s kladným nábojom na dusíku). R¹ a R² sú uhl'ovodíkové zvyšky – alkyly alebo aryly (Obr. 5).

Môžu byť :
- fosfonáty - uhl'ovodíkový zvyšok je priamo viazaný na atóm fosforu,
- fosfáty - naviazané cez atóm kyslíka (Obr. 6),
- fosfoamidy - aspoň jedna zo skupín R¹ alebo R² je mono či disubstituovaný amín alebo obsahuje nesubstituovanú skupinu NH₂.

Atóm viazaný dvojitou väzbou je kyslík, ale môže to byť aj síra. X môže byť viazaná na fosfor cez atóm síry alebo kyslíka a je odstupujúcou skupinou počas hydrolýzy zlúčeniny a viaže sa na AChE. Môže to byť halogén, kyanidová skupina, alifatický alebo aromatický reťazec, heterocyklický zvyšok alebo tioskupina.

Účinný organofosfát má tieto štruktúrne rysy: terminálny atóm viazaný dvojitou väzbou je kyslík (oxo forma), dve lipofilné skupiny (R¹ a R²) viazané priamo na fosfor a dobre odstupujúca skupina – X, taktiež naviazaná priamo. (Greene 2005)



Obr. 6. Všeobecná štruktúra fosfátu / fosfonátu,
X= odstupujúca skupina, R¹,R²= alkyl/aryl

2.3.2. Mechanizmus pôsobenia

Mechanizmus organofosfátmi indukovanej inhibície AChE vyjadruje táto schéma:



kde je E - enzým, PX – organofosfát, E*PX – reverzibilný komplex enzýmu a organofosfátu, EP – fosforylovaný enzým, X – odstupujúca skupina organofosfátu. (Aldridge 1950) Ireverzibilné inhibítory napádajú enzým v dvoch krokoch. Prvý je krátky a rýchly - krátkodobá reverzibilná inaktivácia, jej vplyv je dominantný na začiatku inhibície. V ďalšom kroku pomalá ireverzibilná inhibícia produkuje vysoko stabilný kovalentne viazaný komplex enzým – inhibítor (fosforylovaný enzým). (Costa 2006)

Časovo závislú ireverzibilnú inhibíciu môžeme popísať rovnicou :

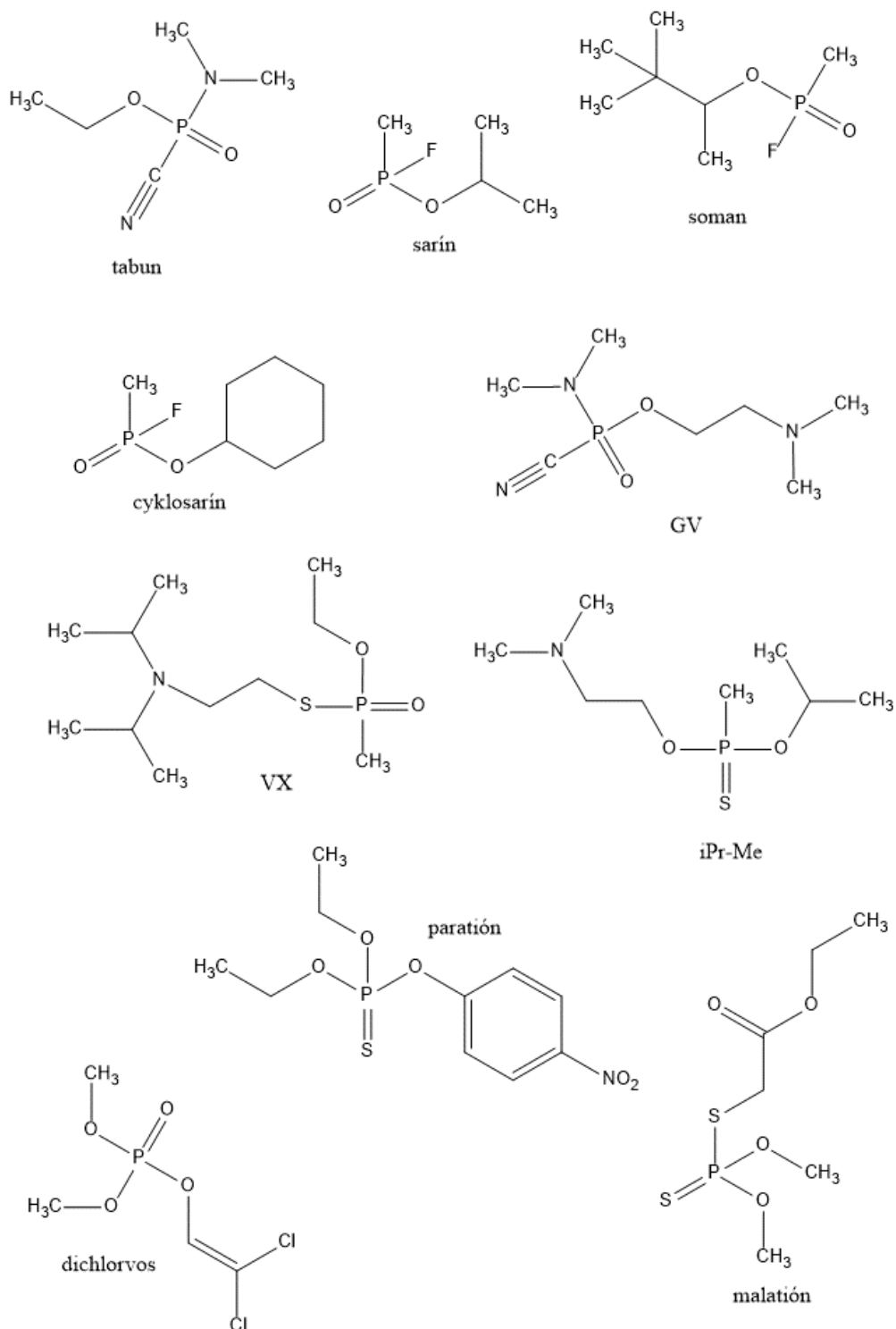
$$\ln \frac{E}{E_0} = - \frac{k_3 \cdot t}{1 + K_1/(I)}$$

kde je E/E₀ – pomer zvyšnej enzýmovej aktivity ku počiatočnej aktivite (E₀), K₁ – disociačná konštanta pre komplex enzým-inhibítor (E*PX), k₃ – konštanta rýchlosti kinetiky prvého rádu premeny reverzibilného komplexu enzým-inhibítor na fosforylovaný enzým (EP), (I) – koncentrácia inhibítora – organofosfátu, t – časový interval po zmiešaní enzýmu a inhibítora. (Čolović 2013)

2.3.3. Toxicita

Organofosfáty (OP) (Obr. 7) sú celosvetovo najčastejšou príčinou otráv či už v oblasti poľnohospodárstva, pokusov o samovraždy, náhodným kontaktom alebo

zneužitím ako bojových plynov. Môžu byť absorbované všetkými cestami – inhalačne, enterálne alebo transdermálne. Oxo-formy OP insekticídov sú rovnako toxické pre teplotkrvné ako aj pre chladnokrvné živočíchy. Tio-formy sú konvertované oxidázami na oxo-formy u chladnokrvných živočíchov na rozdiel od teplotkrvných, kde podstupujú dealkyláciu na netoxické produkty. (Vopršalová 2000, Bajgar 2004)



Obr. 7. Štruktúry organofosfátov

Vyššie 50 rokov sú OP používané ako nešpecifické insekticídy v poľnohospodárstve, kde nahradili už zakázané organochlorové zlúčeniny ako napr. DDT, ktoré sa v prostredí kumulovali. OP totiž v prírode podstupujú prirodzenú degradáciu – cestou oxidácie síce môžu vznikajú ešte účinnejšie deriváty avšak častejšia je hydrolýza až kompletná mineralizácia. (Dannenberg 1998) Treba však dodať, že napriek ich rýchlej degradácii, ich akútna toxicita a riziko intoxikácie je oveľa väčšie. Najväčšia syntéza OP insekticídov sa začala až po druhej svetovej vojne s prvým komerčne dostupným parathionom, následne malathionom, dichlorvosom a inými. Vývoj OP ako nerovných plynov sa začal o niečo skôr s prvým syntetizovaným tabunom, po ňom nasledoval sarín a soman. (Gupta 2011)

Bojové plyny môžeme rozdeliť na G a V radu. G - rada syntetizovaná pôvodne v Nemecku zahŕňa tabun, sarín a soman. Najnebezpečnejšia je inhalácia pár alebo aerosólu, kedy prejavy akútnej otravy nastupujú v ráde minút. Penetrácia cez kožu je však vyššia u neskôr syntetizovanej V – rady, do ktorej patria VE, VG, VM a najznámejšia a najtoxickejšia látka VX. Najnovšia syntetizovaná skupina GV spojila vlastnosti G a V - rady a predstavuje tak riziko rýchlej otravy ako inhalačne tak aj penetráciou cez kožu. (Sage 2004) Napriek tomu, že pojem „bojové plyny“ evokuje predstavu plynného skupenstva, pri izbovej teplote ide o bezfarebné číre kvapaliny s charakteristickým zápachom. Teploty bodu tuhnutia sa pohybujú od -30°C do -56°C a body varu od 158°C do 289°C . Prchavosť pár je porovnateľná s vodou. Najmenej toxické sú pary tabunu nasledované sarínom a somanom až po najtoxickejšiu VX. Toxicita po penetrácii kožou je podobná. Rýchlosť starnutia AChE po intoxikácii je tiež variabilná, od 2 minút pre soman, 5 hodín u sarínu až po 40 hodín pre VX. (Sidell 2007)

Akútna toxicita je charakterizovaná veličinou LD_{50} , čo je zjednodušene dávka, ktorá spôsobí smrť 50% populácie, ktorá bola vystavená pôsobeniu danej toxickej látky. Nie je konštantou, ale skôr štatistickým údajom. Jej hodnota sa líši vzhľadom na druh testovacích subjektov, pohlavie, genetické predispozície, vek, hmotnosť alebo aj hormonálne faktory. Ak by sme porovnali napríklad toxicitu somanu a zlúčeniny rady V, ich toxicita je prakticky rovnaká – LD_{50} somanu je 70-80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a pre iPr-Me z V- rady je LD_{50} 80 - 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. (prehľad hodnôt LD_{50} – tabuľka 1). (Romano 2007)

Látka	Toxicita (LD ₅₀)			
	i.m., potkan (µg/kg)	p.o., potkan (mg/kg)	p.o., člověk (mg/70kg)	i.m., člověk (µg/70kg)
VX	12 - 16	0.08 - 0.09	5	20 - 25
iPr-Me	70 - 100	0.8	–	130 - 150
sarín	200	0.7 - 0.9	8 - 12	–
soman	70 - 80	0.5 - 0.6	7 - 12	–
GV	17	0.19	8	20 - 25
parathion	500 - 600	6 - 7	50 - 200	2800 - 3000
paraoxon	300 - 500	3	30 - 50	300 - 350
trichlorfon	230 000	625	gramy	–
systox	3110	–	–	4000
dimetoát	1000 - 2000	215 - 270	1 - 2g	–
malatión	–	800 - 1200	gramy	–

Tabuľka 1. Porovnanie toxicity (LD₅₀) rôznych organofosfátov; experimentálne hodnoty namerané na potkanoch, hodnoty toxicity pre ľudí sú predpokladané (Bajgar, 2004)

Značný rozdiel je však v LT (lethal time - čas smrti) a CT (convulsion time - čas nástupu kŕčov). Rozdiel medzi G a V - radou je najmä v tom, že pokiaľ G - rada pôsobí rýchlo a akútne, účinok V - rady je obvykle dlhodobejší. Pre soman kŕče začínajú od 2 do 4 minút a smrť sa nedá zvrátiť za 8 až 10 minút, pre látku iPr-Me sa čas CT pohybuje od 8 do 12 minút a LT od 20 - 25 minút. Akútna toxicita však závisí aj od spôsobu kontaktu s toxickou látkou. Pre rovnakú látku toxicita klesá v poradí i.v. > i.m.(s.c.) > i.p. > p.o. > p.c. (Bajgar 2004)

Vzhľadom k tejto vysokej toxicite látok G - rady, hlavne v prípade somanu, je nutné skoré podanie účinného antidota a zaistenie ďalšej liečby.

2.3.4. Otrava organofosfátmi

Intoxikácia organofosfátmi blokujúcimi AChE vedie ku kumulácii acetylcholínu v synaptickej štrbine. Organofosfáty (OP) sa viažu na AChE v tom istom mieste ako acetylcholín a tak blokujú jeho degradáciu, kyselina fosforečná, od ktorej sú

organofosfáty odvodené, sa chová podobne ako karboxylový zvyšok acetylcholínu (ACh), teda fosforyluje serín (viaže sa na koncovú hydroxylovú skupinu serínu). S počasom niekoľkých hodín potom dochádza k ešte jednej chemickej reakcii, kedy je z kovalentne viazaného zvyšku OP ešte odštiepený alkylový zvyšok. Toto tzv. „starnutie“ fosforylovaného enzýmu vedie k definitívnemu a nevratnému zničeniu funkcie enzýmu (Schéma 1). Chemická väzba medzi atómom O enzýmu a P organofosfátu je natoľko pevná, že nedochádza k hydrolýze. Navyše, čím je kontakt s enzýmom dlhší, tým je inhibícia silnejšia. Obzvlášť agresívne bojové plyny odštiepujú pre organizmus toxické kyano (-CN) alebo fluoro (-F) skupiny. (Jokanović 2009, Vopršalová 2000)

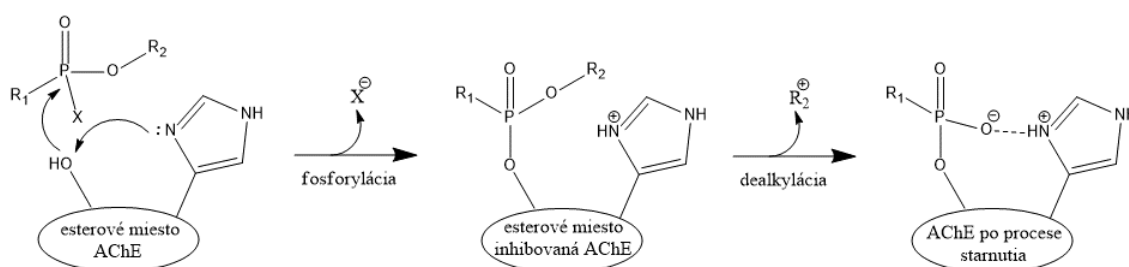


Schéma 1. Proces inhibície acetylcholinesterázy

Výsledkom je otrava s príznakmi, ktoré zodpovedajú zosilnenému fyziologickému účinku acetylcholínu na muskarínových a nikotínových receptoroch. Počiatočné symptómy sú závislé na spôsobe intoxikácie. Pri zasiahnutí parami je ako prvé postihnuté oko a dýchacia sústava, pri perorálnom použití sa otrava ako prvá prejaví zasiahnutím gastrointestinálneho traktu. Periférne muskarínové symptómy zahŕňajú nadmernú saliváciu, potenie a lakrimáciu. Vplyv na hladké svaly pozorujeme ako miózu oka, únik moču a stolice a kŕče v oblasti brucha. Periférne nikotínové symptómy zahŕňajú tachykardiu, hypertenziu, svalové fascikulácie až paralýzu, vrátane paralýzy dýchacích svalov. Na úrovni centrálného nervového systému sa intoxikácia prejavuje nešpecifickými symptómami ako zmätenosť, ataxia, bolesť hlavy, tras, strata reflexov až kóma. Smrť nastáva následkom bronchospasmu a paralýzy dýchacieho svalstva. (Mladěnka 2015, Bajgar 2007) OP však zasahujú aj iné orgány a štruktúry. Dôsledky otravy preto môžeme rozdeliť do troch fáz: cholinergná fáza charakterizovaná vyššie, prechodná fáza s cholinergnými aj necholinergnými prejavmi a necholinergná fáza

s nešpecifickými prejavmi vrátane organofosfátovo-indukovanej oneskorenej neurotoxicity (OPIDN – organophosphate induced delayed neurotoxicity/neuropathy). Prejavuje sa poruchami motoriky a periférneho nervového systému (atrofia svalov nôh), pričom náprava je možná ale zdĺhavá a neprirodzené reflexy po prekonanej otrave sú prítomné aj roky. (Chowdhary 2014) Ďalším problémom liečby je aj fakt, že OP sú silne lipofilné látky a teda vytvárajú depo v tukovom tkanive, odkiaľ sa časom uvoľňujú.

2.3.5. Terapia

Štandardná liečba zahŕňa v prvom rade zamedzenie ďalšieho kontaktu s OP, dekontamináciu kože, pri požití per os výplach žalúdka ideálne do 2 hodín a podanie aktívneho uhlia. Cielená terapia pozostáva z troch krokov. Primárne sa podáva atropín i.v. ako parasymptolytikum, ktorého hlavným cieľom je zvrátiť cholinergný efekt OP účinkom na muskarínových a nikotínových receptoroch antagonistickým k nahromadenému ACh. Taktiež sa podáva diazepam i.v. ako antikonvulzívum. Alosterickou modifikáciou GABA receptorov diazepamom dochádza k zvýšenej frekvencii otvárania chloridových kanálov, následnej hyperpolarizácii a zabráneniu šírenia nervového vzruchu. (Jokanović 2009, Chowdhary 2014) Ako špecifické antidotá sa používajú reaktivátory AChE.

2.4. Reaktivátory AChE

Pri podozrení na otravu organofosfátmi sa hneď po symptomatickej liečbe atropínom nasadzuje liečba kauzálnymi antidotami – oximami, ktoré obsahujú v molekule funkčnú oximovú skupinu ($R-CH=NOH$). Musia ale byť podané ešte pred procesom starnutia (stratou alkylu alebo alkoxy skupiny). Úlohou oximov je vyviazať organofosfát z enzýmu a tak zabrániť vzniku kovalentnej väzby enzým-organofosfát. Po vyviazaní organofosfátu z enzýmu dochádza k obnove pôvodnej funkcie. (Kuča 2003) Pre úspešnú reaktiváciu sú podstatné štyri vlastnosti molekuly, ktoré ovplyvňujú afinitu k inhibovanej AChE. Prvým faktorom je prítomnosť kvartérneho dusíka. Podľa počtu kvartérnych dusíkov v molekule rozdeľujeme oximy na monokvartérne a biskvartérne.

Neskôr bolo zistené, že prítomnosť druhej aldoximovej skupiny nie je pre účinnosť

nevyhnutná, ale zvyšuje afinitu k inhibovanej AChE. (Gorecki 2016) Druhým faktorom je dĺžka spojovacieho reťazca medzi dusíkmi biskvartérnych molekúl, ktorá ovplyvňuje účinnosť voči OP. Ideálna dĺžka reťazca pre reaktiváciu AChE inhibovanú tabunom, sarínom alebo VX sú 3 až 4 uhlíky. Metoxim, ktorý má len jednouhlíkatý spojovací reťazec, zase vykazuje aktivitu voči inhibícii cyklosarínom. Najpodstatnejším faktorom je však prítomnosť oximovej skupiny, ktorá je zodpovedná za reaktiváciu (Schéma 2). Posledným faktorom je pozícia oximovej skupiny na aromatickom jadre. Najsilnejší reaktivačný efekt vykazujú molekuly, v ktorých je reaktivujúca oximová skupina vzdialená od kvartérneho dusíka rovnako ako je vzdialenosť medzi anionickým a esterovým miestom enzýmu a teda v pozícii 2 a 4. Takéto usporiadanie zabezpečuje dobrú afinitu k AChE. (Patočka 2005, Musílek 2011) Ďalšou podstatnou vlastnosťou je disociačná konštanta (pK_a), keďže na odstránenie fosforylovej skupiny a reaktiváciu AChE je nutný disociovaný oximátový anión. Avšak na prestup cez biologické bariéry, hlavne HEB, je potrebná nedisociovaná molekula. Preto sa pK_a hodnota týchto zlúčenín obvykle pohybuje od 7.04 pre HLö7 do 8.2 pre trimedoxim. (Gorecki 2016)

Pre klinické použitie je taktiež podstatná chemická vlastnosť stability vodných roztokov liečiva. Pralidoxim, metoxim a obidoxim sú vo vode relatívne stabilné a sú vyrábané ako roztoky. Oximy HI-6 a HIö-7 sú vo vode nestabilné a preto sa vyrábajú ako lyofilizáty. (Kassa 2002) Najznámejšie používané oximy sú znázornené na Obr. 8.

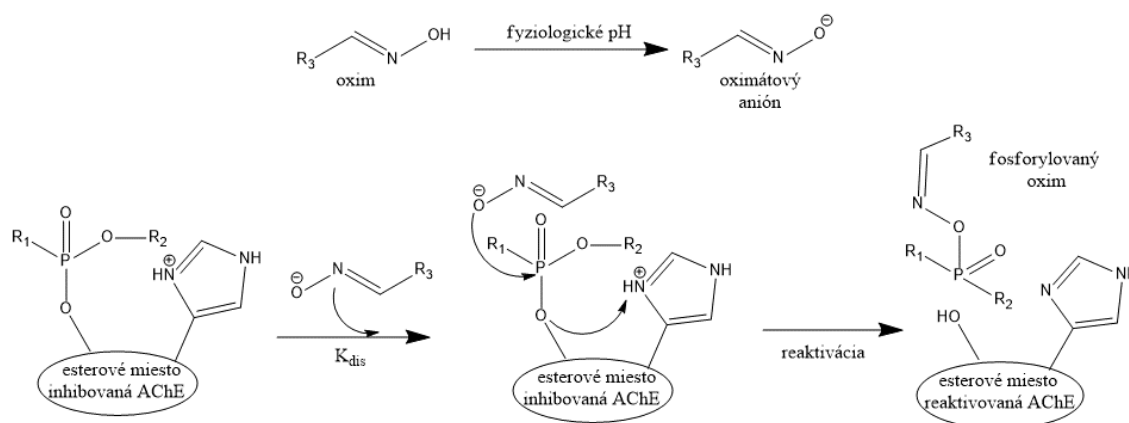
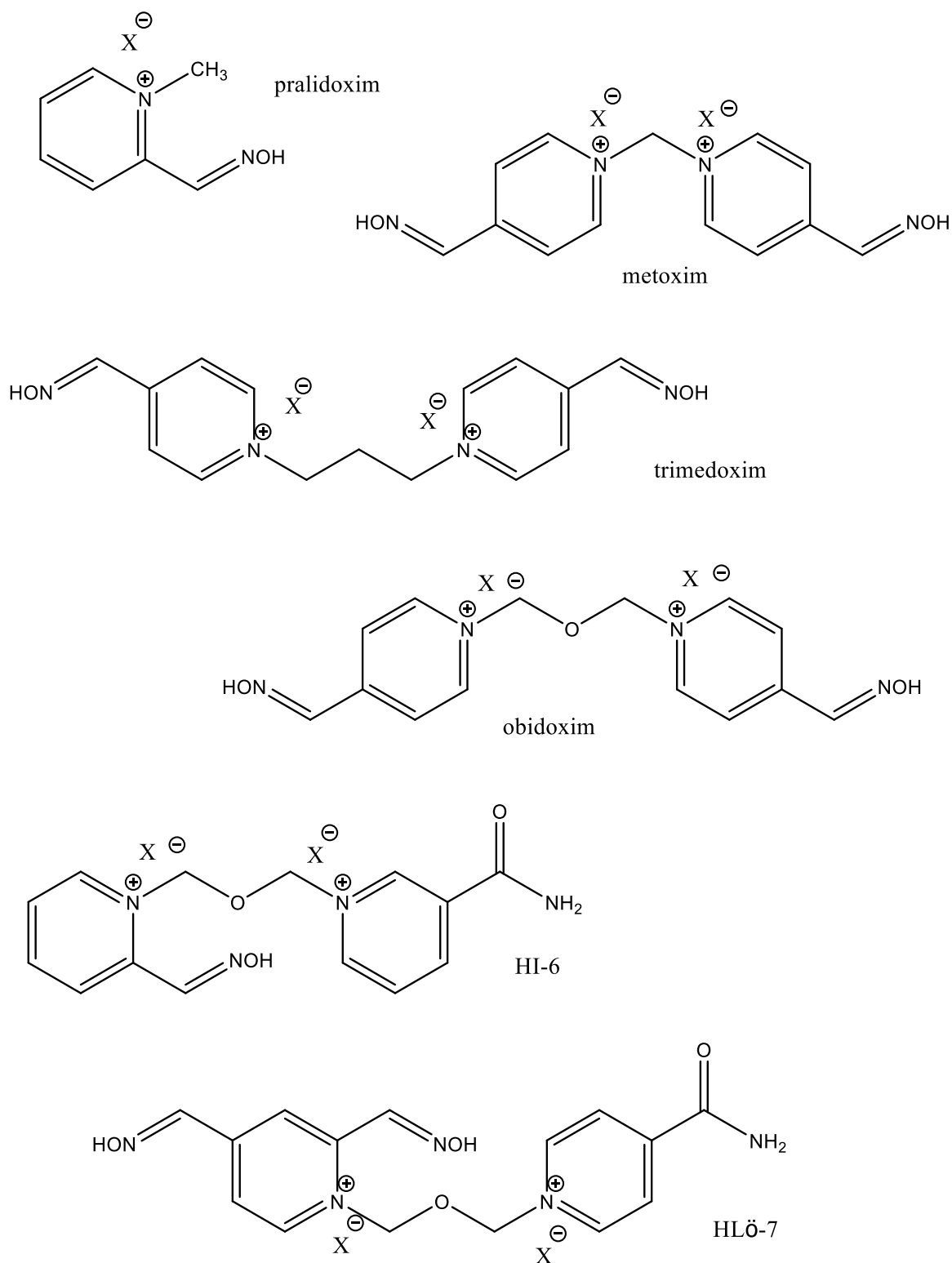


Schéma 2. Reaktivácia acetylcholinesterázy



Obr. 8. Štruktúry známych reaktivátorov acetylcholinesterázy

2.4.1. Farmakokinetika

Reaktivátory sú väčšinou vo forme solí rozpustných vo vode (chloridy, bromidy, methylsulfáty apod.). Typická je i.m. aplikácia. Na dosiahnutie účinku je nutná koncentrácia liečiva v plazme 4 $\mu\text{g/ml}$. Terapeutická dávka sa teda pohybuje v miligramoch na kilogram. Pralidoxim býva podávaný v dávke 10 mg/kg, doba nástupu je 5 - 10 minút a jeho účinok trvá 50 - 55 minút. U obidoximu sa podáva 5 mg/kg, nástup účinku je podobný, ale účinnosť je dlhšia, 120-180 minút. (Sidell 2007) Dávka HI-6 je 200 alebo 500 mg i.m., požadovanú koncentráciu v plazme dosahuje za 4 - 6 minút a účinok pretrváva 125 (250mg) alebo 250 minút (500mg). Farmakokinetika HLö-7 je podobná ako HI-6. (Kassa 2002) Vylučovanie oximov prebieha z 99% močom, pričom rýchlosť je rôzna v závislosti od štruktúry. (Sidell 2007, Šepsová 2011)

2.4.2. Účinnosť

Vo všeobecnosti je účinnosť oximového reaktivátora závislá na afinite k inhibovanému enzýmu. (Shih 1993) Afinita oximov k inhibovanému enzýmu je charakterizovaná disociačnou konštantou komplexu enzým-reaktivátor (K_{dis}) – vyššia hodnota K_{dis} odpovedá zníženej afinite reaktivátora k enzýmu. Afinita je daná viacerými fyzikálno-chemickými faktormi ako sterickej kompatibilita, elektrostatické efekty, hydrofóbne interakcie, štruktúra a veľkosť molekuly a funkčných skupín. (Bieger 1967) Efektivita liečby závisí od použitia konkrétneho reaktivátora a taktiež od rýchlosti starnutia komplexu enzým-organofosfát. Obvyklé reaktivátory (pralidoxim a obidoxim) sú vhodné na liečbu intoxikácie sarínom a VX ale sú neúčinné voči somanu. Pre intoxikáciu somanom, ktorého hlavný problém liečby spočíva v rýchlom starnutí (rádovo minúty), bola vyvinutá skupina H-oximov. Konkrétne HI-6 v kombinácii s anticholinergikami je relatívne úspešná. (Bajgar 2004) Terapeutická účinnosť je najčastejšie meraná ochranným koeficientom (PR - protective ratio) z LD_{50} príslušného OP u liečených zvierat v porovnaní s neliečenými. Používa sa kombinácia atropínu s oximom. Účinnosť je variabilná v závislosti od druhu zvierat'a, napr. obidoxim je u myši účinnejší ako pralidoxim aj HI-6, u potkanov už nie je. Pri tabune nie je dostatočne účinná ani kombinácia bežných oximov, ani H-oximov vrátane HI-6. Kombinácia HI-6 a atropínu je účinná proti somanu, nezávisle na druhu. Pralidoxim, obidoxim alebo HI-6

sú vysoko účinné proti VX. Avšak účinné dávky obidoximu v experimentoch sú značne vyššie (2% LD₅₀) a tým znižujú bezpečnostný profil liečiva na rozdiel od HI-6 a HI-7, ktorých terapeutický index je širší a sú považované sa bezpečné aj vo vyšších dávkach. (Kassa 2002)

Terapia známymi oximovými reaktivátormi je stále nedostatočná a má tri hlavné nevýhody. Stále neexistuje širokospektrálne liečivo účinné na reaktiváciu AChE pri intoxikácii rôznymi OP. (Korabecny 2014) Ďalším problémom je, že všetky na trhu dostupné oximy sú z veľkej časti v krvi disociované a preto ich prechod cez hematoencefalickú bariéru (HEB) je nedostatočný. Konkrétne pralidoxim prechádza HEB len z 10% a biskvartérne deriváty len z 1 - 3%. (Bajgar 2007) Taktiež žiaden zo známych reaktivátorov nie je schopný reaktivovať enzým, ktorý prešiel procesom starnutia. (Gorecki 2016) Tieto nevýhody podnecujú ďalší výskum a syntézu nových reaktivátorov AChE, čo je cieľom aj tejto diplomovej práce.

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Štruktúry pripravovaných zlúčenín boli potvrdené pomocou ^1H NMR a ^{13}C NMR spektroskopie a HRMS spektier. ^1H NMR a ^{13}C NMR spektrá boli merané na spektrometri VNMR S500. Chemické posuny boli interpretované ako δ hodnoty v parts per million (ppm) and boli nepriamo vzťahované k tetrametylsilanu (TMS) pomocou signálu rozpúšťadla. Interakčné konštanty (J) sú uvádzané v Hz. Hmotnostná spektrometria bola meraná použitím prístroja Q Exactive Plus.

Všetky chemikálie boli nakúpené u firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Nemecko) a Penta (Česká republika) a boli použité bez ďalšej purifikácie. TLC bolo vykonané na platničkách Merck Silica gél 60 F254. Merck Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm) bol používaný pre stĺpcové chromatografie.

Body topenia boli merané prístrojom Stuart SMP30 a nie sú korigované.

3.1. Príprava izochinolín-5-oximu (východisková látka) (2)

Syntéza:

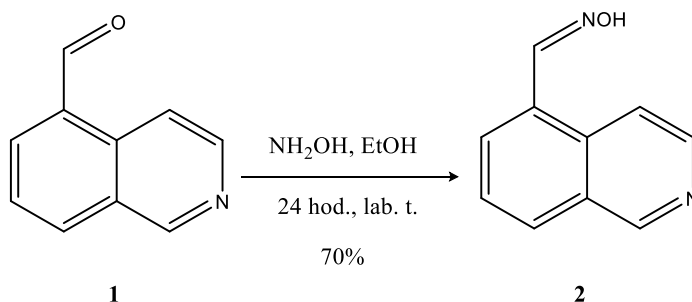


Schéma 3. Syntéza východiskovej látky 2

Schéma adično-eliminačný mechanizmus prípravy oximového derivátu 2:

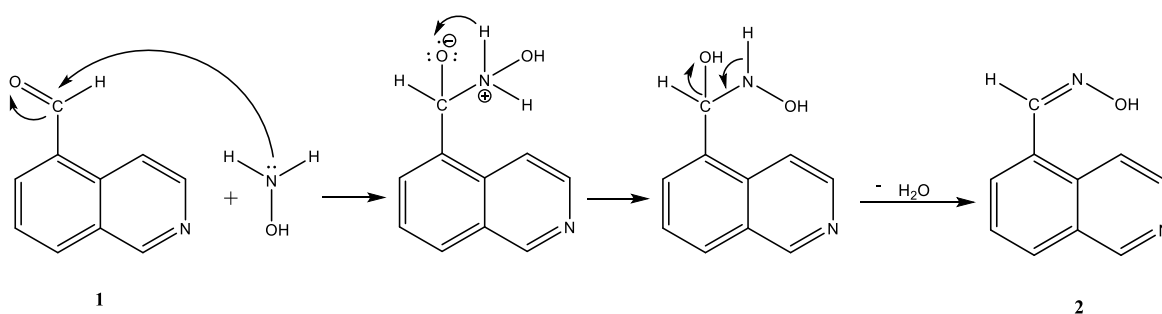


Schéma 4. Adično – eliminačný mechanizmus prípravy oximu 2

Postup:

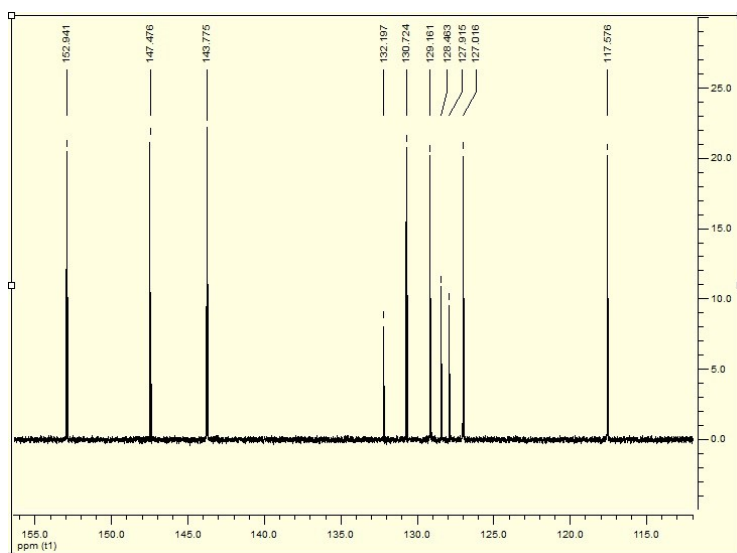
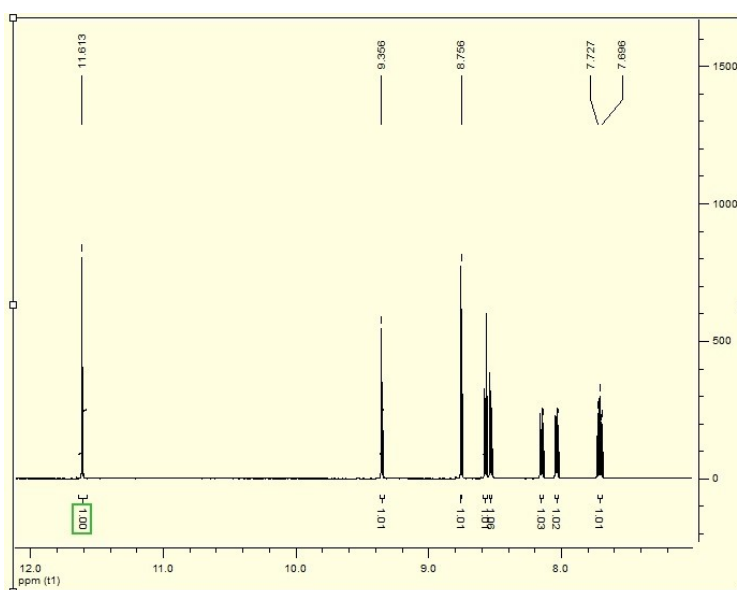
K roztoku komerčne dostupného izochinolín-5-karbaldehydu (**1**) (500 mg, 3,18 mmol) v etanole (50 ml) sa pridal 50% roztok hydroxylamínu vo vode (0,4 ml, 6,4 mmol). Zmes bola miešaná na magnetickej miešačke pri laboratórnej teplote 24 hodín. Priebeh reakcie a čistota produktu pri syntéze bola kontrolovaná pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze etylacetát - metanol (19:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Následne bola reakčná zmes odparená s prídavkom silikagelu a bola prevedená stĺpcová chromatografia (mobilná fáza: heptan - etylacetát = 1:1). ^1H a ^{13}C NMR spektrá boli merané pri laboratórnej teplote v DMSO.

Výtěžok: 70% (547,8 g), biela kryštalická látka

$^1\text{H NMR}$ (DMSO, 500 MHz): δ 11,61 (s, 1H, NOH); 9,36 (s, 1H, ArH); 8,76 (s, 1H, CH=N);

8,57 (d, $J = 6,0\text{Hz}$, 1H, ArH); 8,53 (d, $J = 6,0\text{ Hz}$, 1H, ArH); 8,15 (d, $J = 8,2\text{Hz}$, 1H, ArH); 8,04 (d, $J = 7,1\text{ Hz}$, 1H, ArH); 7,73 – 7,70 (m, 1H, ArH)

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, 126 MHz): δ 152,9; 147,5; 143,8; 132,2; 130,7; 129,2; 128,5; 127,9; 127,0; 117,6



Obr. 9. $^1\text{H NMR}$ a $^{13}\text{CNMR}$ spektrum oximu 2

3.2. Príprava monokvartérnej soli

3.2.1. 5-[(hydroxyimino)metyl]-2-metylizochinolín-2-ium jódid (**4**)

Syntéza:

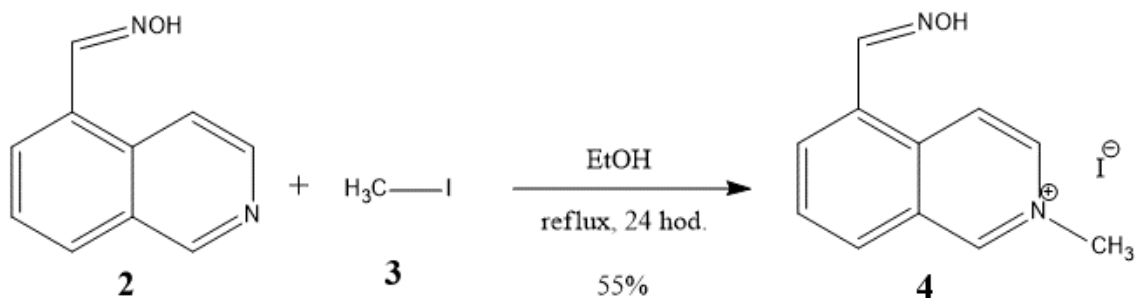


Schéma 5. Syntéza látky **4**

Postup:

K zmesi východiskovej látky **2** (100 mg, 0,58 mmol) v etanole (1 ml) sme po rozpustení pridali metyljódid (**3**) (0,072 ml, 1,16 mmol). Zmes sme nechali zahrievať pod refluxom po dobu 24 hodín, následne sme ju ešte za tepla prefiltrovali a premyli etanolom.

Na filtri ostal žltý prášok produktu **4**, ktorý sme zoškrabali a vysušili. Priebeh reakcie a čistota produktu pri syntéze sme skontrolovali pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze chloroform - metanol (10:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. ^1H a ^{13}C NMR spektrá boli merané pri laboratórnej teplote v DMSO.

$C_{11}H_{11}N_2OI$

Výtěžok: 55% (130 mg), žltá kryštalická látka

Cal.M(g.mol⁻¹) = 314,1223; Cal. [m/z] = 187,0866; Exp. [m/z] = 187,0863

Teplota topenia: 220,0 – 221,5°C

¹H NMR (DMSO, 500 MHz): δ 11,94 (s, 1H, NOH); 10,08 (s, 1H, ArH); 9,12 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz, ArH); 8,88 (s, 1H, CH=N); 8,79 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz, ArH); 8,49 - 8,47 (m, 2H, 2 x ArH); 8,10 - 8,08 (m, 1H, ArH); 4,49 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz): δ 151,0; 146,4; 136,4; 135,7; 133,5; 131,8; 130,8; 128,9; 127,7; 122,7; 47,7

3.3. Příprava biskvartérnych izochinolínových solí

Syntéza:

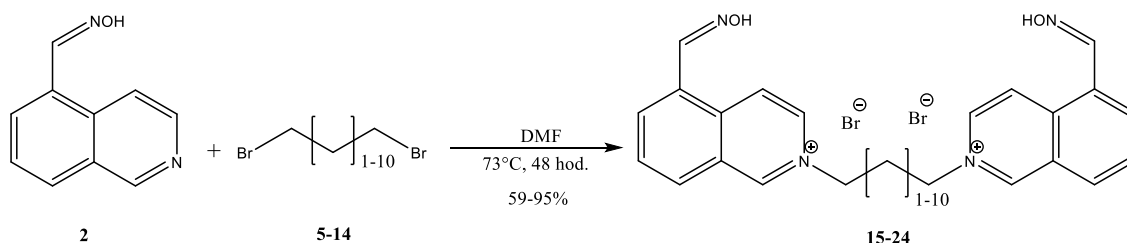


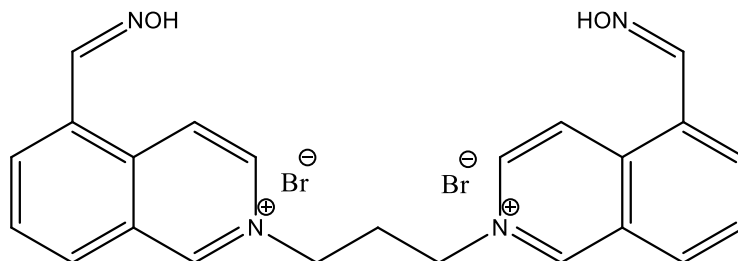
Schéma 6. Syntéza derivátov **15-24**

Postup:

K zmesi oximu **2** (0,58 mmol) v DMF (0,5 ml) sme pridali dibromid alkylového reťazca C₃-C₁₂ (**5-14**) (0,26 mmol). Reakciu sme nechali prebiehať pri teplote 73°C 48 hodín. Následne sme reakčnú zmes nechali vychladnúť, pridali sme toluén a rozpúšťadla odparili azeotropickou destiláciou na vákuovej odparke, kým sme nezískali surový produkt (**15-24**). Následne sme produkt 2 hodiny precipitovali z acetónu a vákuovo prefiltrovali. Priebeh reakcií a čistotu jednotlivých produktov pri syntéze sme skontrolovali pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze chloroform-metanol (5:1). Detekcia bola prevedená UV lampou.

¹H a ¹³C NMR spektrá pripravených zlúčenín boli merané pri laboratórnej teplote v DMSO alebo CD₃OD.

3.3.1. 2,2'-(propán-1,3-diyl)bis{5-[(hydroxyimino)metyl]izochinolín-2-ium} dibrómid (15)



$C_{23}H_{22}N_4O_2Br_2$

Výt'azok: 69% (144 mg), biela kryštálická látka

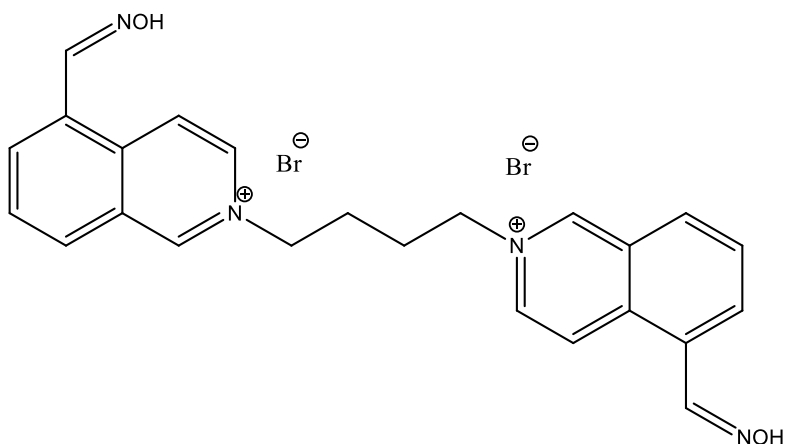
Cal.M(g.mol⁻¹) = 546,26300; Cal. [m/2z] = 193,0866; Exp. [m/2z] = 193,0866

Teplota topenia: 249,0 – 251,0°C

¹H NMR (DMSO, 500 MHz): δ 11,96 (s, 2H, 2 x NOH); 10,35 (s, 2H, 2 x ArH); 9,17 (d, 2H, J = 7,1Hz, 2 x ArH); 9,01 (d, 2H, J = 7,0Hz, 2 x ArH); 8,89 (s, 2H, 2 x CH=N); 8,52 - 8,47 (m, 4H, 4 x ArH); 8,12 - 8,09 (m, 2H, 2 x ArH); 5,00 - 4,97 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,98 - 2,93 (m, 2H, CH₂)

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz): δ 150,8; 146,3; 136,0; 135,5; 134,0; 131,5; 130,9; 129,0; 127,9; 123,3; 57,3; 30,9

3.3.2. 2,2'-(bután-1,4-diyl)bis{5-[(hydroxyimino)metyl]izochinolín-2-ium}
dibrómide (16)



$C_{24}H_{24}N_4O_2Br_2$

Výtazok: 80% (124 mg), svetložltá kryštalická látka

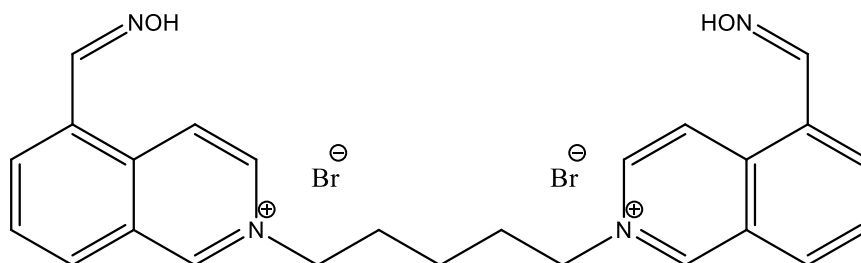
Cal.M(g.mol⁻¹) = 560,28069; Cal. [m/2z] = 200,0944; Exp. [m/2z] = 200,0942

Teplota topenia: 246,5 – 248,5°C

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 10,04 (s, 2H, 2 x ArH); 9,39 (d, 2H, *J* = 7,7Hz, 2 x ArH); 8,77 (d, 2H, *J* = 7,7Hz, 2 x ArH); 8,74 (s, 2H, 2 x CH=N); 8,45 (d, 2H, *J* = 7,9Hz, 2 x ArH); 8,41 (d, 2H, *J* = 7,4Hz, 2 x ArH); 8,10 - 8,05 (m, 2H, 2 x ArH); 4,92 - 4,89 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,33 - 2,27 (m, 4H, 2 x CH₂)

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): v dôsledku zlej rozpustnosti nebolo meranie uskutočnené

3.3.3. 2,2'-(pentán-1,5-diyl)bis{5-[(hydroxyimino)metyl]izochinolín-2-ium} dibrómid (17)



$C_{25}H_{26}N_4O_2Br_2$

Výtěžok: 92% (140 mg), svetlohnedá kryštalická látka

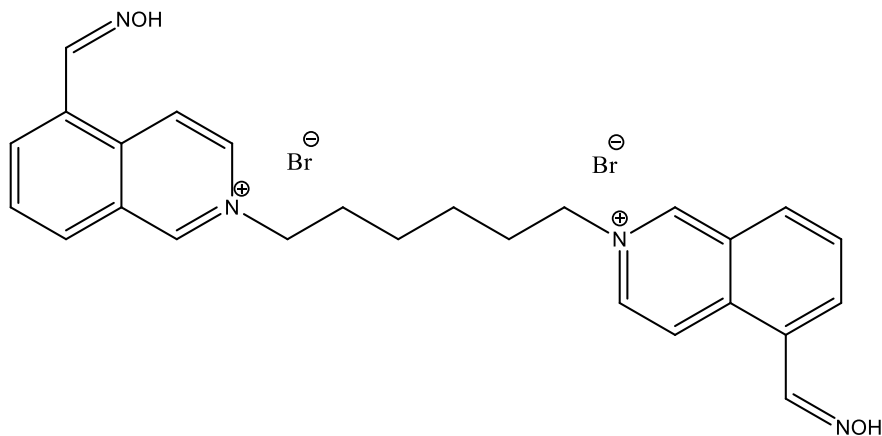
Cal.M(g.mol⁻¹) = 574,30754; Cal. [m/2z] = 207,1022; Exp. [m/2z] = 207,1020

Teplota topenia: 207,0 – 209,0°C

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 10,04 (s, 2H, 2 x ArH); 9,33 (d, 2H, *J* = 7,0Hz, 2 x ArH); 8,75 (d, 2H, *J* = 7,1Hz, 2 x ArH); 8,71 (s, 2H, 2 x CH=N); 8,48 (d, 2H, *J* = 8,3Hz, 2 x ArH); 8,38 (d, 2H, *J* = 7,2Hz, 2 x ArH); 8,08 - 8,05 (m, 2H, 2 x ArH); 4,86 - 4,83 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,29 - 2,27 (m, 4H, 2 x CH₂); 1,64 - 1,58 (m, 2H, CH₂)

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 151,3; 148,2; 138,7; 136,4; 136,2; 132,6; 132,4; 131,3; 130,2; 125,9; 62,3; 31,5; 23,9

3.3.4. 2,2'-(hexán-1,6-diyl)bis{5-[(hydroxyimino)metyl]izochinolín-2-ium} dibrómid (18)



$C_{26}H_{28}N_4O_2Br_2$

Výt'azok: 63% (69 mg), biela kryštalická látka

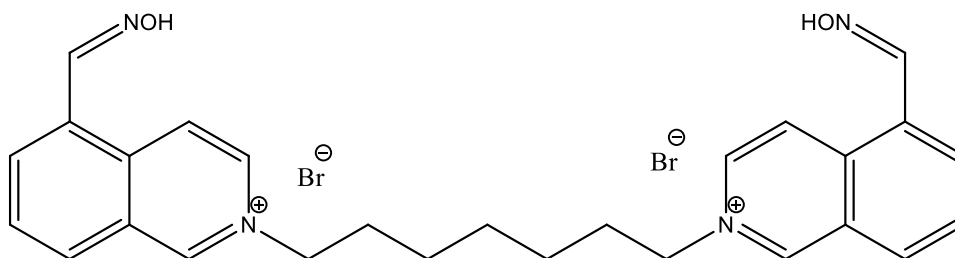
Cal.M(g.mol⁻¹) = 588,33421; Cal. [m/2z] = 214,1101; Exp. [m/2z] = 214,1098

Teplota topenia: 249,5 – 250,5°C

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 10,02 (s, 2H, 2 x ArH); 9,37 (d, 2H, *J* = 7,1Hz, 2 x ArH); 8,75 (d, 2H, *J* = 7,1Hz, 2 x ArH); 8,73 (s, 2H, 2 x CH=N); 8,47 (d, 2H, *J* = 8,3Hz, 2 x ArH); 8,40 (d, 2H, *J* = 7,2Hz, 2 x ArH); 8,09 - 8,06 (m, 2H, 2 x ArH); 4,82 - 4,79 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,19 - 2,16 (m, 4H, 2 x CH₂); 1,59 - 1,56 (m, 4H, 2 x CH₂)

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): v dôsledku zlej rozpustnosti nebolo meranie uskutočnené

3.3.5. 2,2'-(heptán-1,7-diyl)bis{5-[(hydroxyimino)metyl]izochinolín-2-ium} dibrómid (19)



$C_{27}H_{30}N_4O_2Br_2$

Výt'azok: 88% (140 mg), biela kryštálická látka

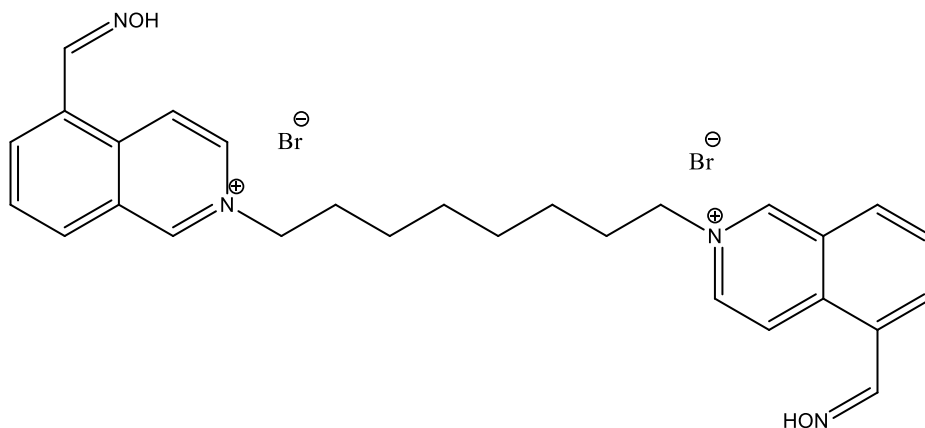
Cal.M(g.mol⁻¹) = 602,36070; Cal. [m/2z] = 221,1179; Exp. [m/2z] = 221,1177

Teplota topenia: 242,0 – 243,5°C

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 10,02 (s, 2H, 2 x ArH); 9,36 (d, 2H, *J* = 7,1Hz, 2 x ArH); 8,76 (d, 2H, *J* = 7,1Hz, 2 x ArH); 8,72 (s, 2H, 2 x CH=N); 8,47 (d, 2H, *J* = 8,4Hz, 2 x ArH); 8,39 (d, 2H, *J* = 7,3Hz, 2 x ArH); 8,09 - 8,06 (m, 2H, 2 x ArH); 4,81 - 4,78 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,19 - 2,13 (m, 4H, 2 x CH₂); 1,56 - 1,47 (m, 6H, 3 x CH₂)

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 151,3; 148,2; 138,6; 136,4; 136,1; 132,5; 132,4; 131,3; 130,2; 125,9; 62,7; 32,1; 29,5; 27,0

3.3.6. 2,2'-(oktán-1,8-diyl)bis{5-[(hydroxyimino)metyl]izochinolín-2-ium} dibrómid (20)



$C_{28}H_{32}N_4O_2Br_2$

Výtťažok: 84% (71 mg), biela kryštálická látka

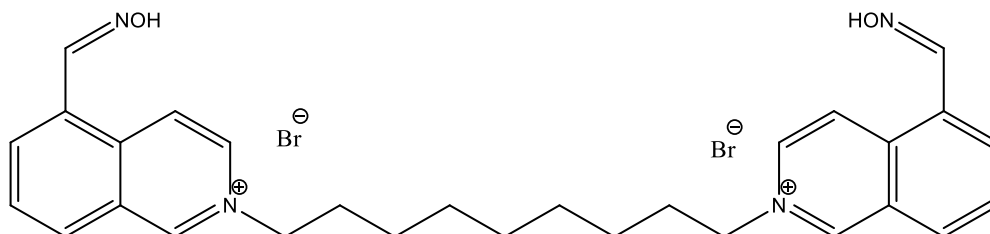
Cal.M(g.mol⁻¹) = 616,38728; Cal. [m/2z] = 228,1257; Exp. [m/2z] = 228,1255

Teplota topenia: 246,0 – 247,1°C

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 10,00 (s, 2H, 2 x ArH); 9,37 (d, 2H, *J* = 7,1Hz, 2 x ArH); 8,75 (d, 2H, *J* = 7,1Hz, 2 x ArH); 8,73 (s, 2H, 2 x CH=N); 8,47 (d, 2H, *J* = 8,2Hz, 2 x ArH); 8,40 (d, 2H, *J* = 7,3Hz, 2 x ArH); 8,09 - 8,06 (m, 2H, 2 x ArH); 4,79 - 4,76 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,16 - 2,13 (m, 4H, 2 x CH₂); 1,47 - 1,30 (m, 8H, 4 x CH₂)

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): v dôsledku zlej rozpustnosti nebolo meranie uskutočnené

3.3.7. 2,2'-(nonán-1,9-diyl)bis{5-[(hydroxyimino)metyl]izochinolin-2-ium} dibrómid (21)



$C_{29}H_{34}N_4O_2Br_2$

Výtťažok: 78% (128 mg), biela kryštálická látka

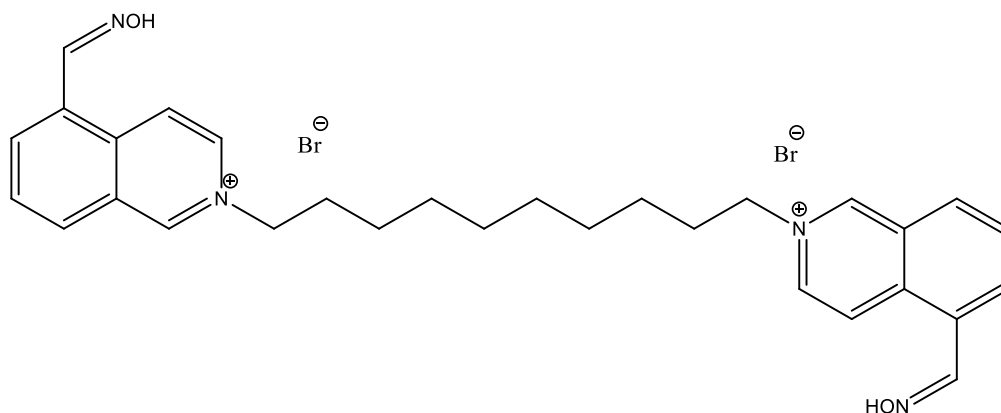
Cal.M(g.mol⁻¹) = 630,41386; Cal. [m/2z] = 235,1335; Exp. [m/2z] = 235,1333

Teplota topenia: 247,5 – 248,5°C

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 10,01 (s, 2H, 2 x ArH); 9,36 (d, 2H, *J* = 7,0Hz, 2 x ArH); 8,74 (d, 2H, *J* = 6,9Hz, 2 x ArH); 8,72 (s, 2H, 2 x CH=N); 8,47 (d, 2H, *J* = 8,3Hz, 2 x ArH); 8,39 (d, 2H, *J* = 7,3Hz, 2 x ArH); 8,08 - 8,05 (m, 2H, 2 x ArH); 4,79 - 4,76 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,14 - 2,10 (m, 4H, 2 x CH₂); 1,45 - 1,38 (m, 10H, 5 x CH₂)

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 151,2; 148,2; 138,5; 136,4; 136,1; 132,5; 132,4; 131,2; 130,2; 125,9; 62,7; 32,3; 30,2; 30,0; 27,3

3.3.8. 2,2'-(dekán-1,10-diyl)bis{5-[(hydroxyimino)metyl]izochinolín-2-ium} dibrómid (22)



$C_{30}H_{36}N_4O_2Br_2$

Výtťažok: 95% (84 mg), biela kryštálická látka

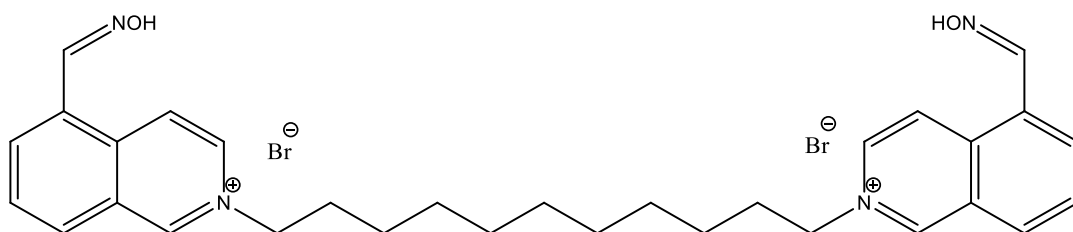
Cal.M(g.mol⁻¹) = 644,44044; Cal. [m/2z] = 242,1414; Exp. [m/2z] = 242,1409

Teplota topenia: 240,5 – 241,5°C

¹H NMR (DMSO, 500 MHz): δ 11,94 (s, 2H, 2 x NOH); 10,27 (s, 2H, 2 x ArH); 9,16 (d, 2H, *J* = 6,8Hz, 2 x ArH); 8,95 (d, 2H, *J* = 6,7Hz, 2 x ArH); 8,89 (s, 2H, 2 x CH=N); 8,52 - 8,46 (m, 4H, 4 x ArH); 8,12 - 8,08 (m, 2H, 2 x ArH); 4,75 - 4,73 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,07 - 1,98 (m, 4H, 2 x CH₂); 1,31 - 1,25 (m, 12H, 6 x CH₂)

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz): δ 150,3; 146,4; 135,8; 135,5; 133,8; 131,4; 130,8; 129,0; 127,9; 123,2; 60,5; 30,3; 28,6; 28,3; 25,4

3.3.9. 2,2'-(undekán-1,11-diyl)bis{5-[(hydroxyimino)metyl] izochinolín-2-ium} dibromid (23)



$C_{31}H_{38}N_4O_2Br_2$

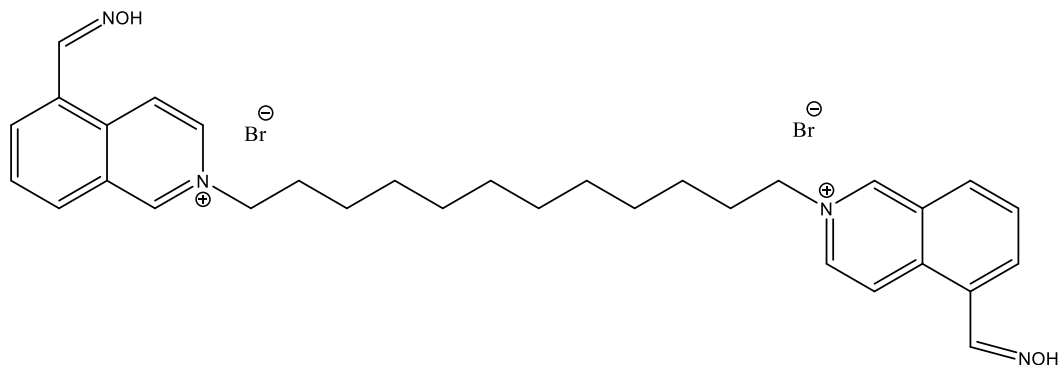
Výtěžok: 59% (102 mg), žltá olejovitá kvapalina

Cal.M(g.mol⁻¹) = 658,46702; Cal. [m/z] = 249,1492; Exp. [m/z] = 249,1488

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 10,04 (s, 2H, 2 x ArH); 9,35 (d, 2H, *J* = 7,1Hz, 2 x ArH); 8,77 (d, 2H, *J* = 7,1Hz, 2 x ArH); 8,70 (s, 2H, 2 x CH=N); 8,48 (d, 2H, *J* = 8,3Hz, 2 x ArH); 8,37 (d, 2H, *J* = 7,2Hz, 2 x ArH); 8,08 - 8,04 (m, 2H, 2 x ArH); 4,81 - 4,78 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,17 - 2,11 (m, 4H, 2 x CH₂); 1,47 - 1,32 (m, 14H, 7 x CH₂)

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 151,2; 148,2; 138,5; 136,5; 136,0; 132,5; 132,3; 131,1; 130,2; 125,8; 62,9; 32,3; 30,4; 30,4; 30,1; 27,3

3.3.10. 2,2'-(dodekán-1,12-diyl)bis{5-[(hydroxyimino)metyl] izochinolín-2-ium} dibrómid (24)



$C_{32}H_{40}N_4O_2Br_2$

Výtěžok: 63% (58 mg), tmavožltá kryštalická látka

Cal.M(g.mol⁻¹) = 672,49360; Cal. [m/z] = 256,1570; Exp. [m/z] = 256,1567

Teplota topenia: 70,5 – 72,5°C

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 10,03 (s, 2H, 2 x ArH); 9,35 (d, 2H, *J* = 7,1 Hz, 2 x ArH); 8,76 (d, 2H, *J* = 7,1Hz, 2 x ArH); 8,70 (s, 2H, 2 x CH=N); 8,48 (d, 2H, *J* = 8,2Hz, 2 x ArH); 8,37 (d, 2H, *J* = 7,3Hz, 2 x ArH); 8,08 - 8,05 (m, 2H, 2 x ArH); 4,81 - 4,78 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,16 - 2,10 (m, 4H, 2 x CH₂); 1,45 - 1,30 (m, 16H, 8 x CH₂)
¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 151,2; 148,2; 138,5; 136,5; 136,1; 132,5; 132,3; 131,2; 130,2; 125,8; 62,9; 32,4; 30,6; 30,5; 30,1; 27,3

3.4. Príprava biskvartérnych izochinolínovo-izonikotínamidových solí

Syntéza:

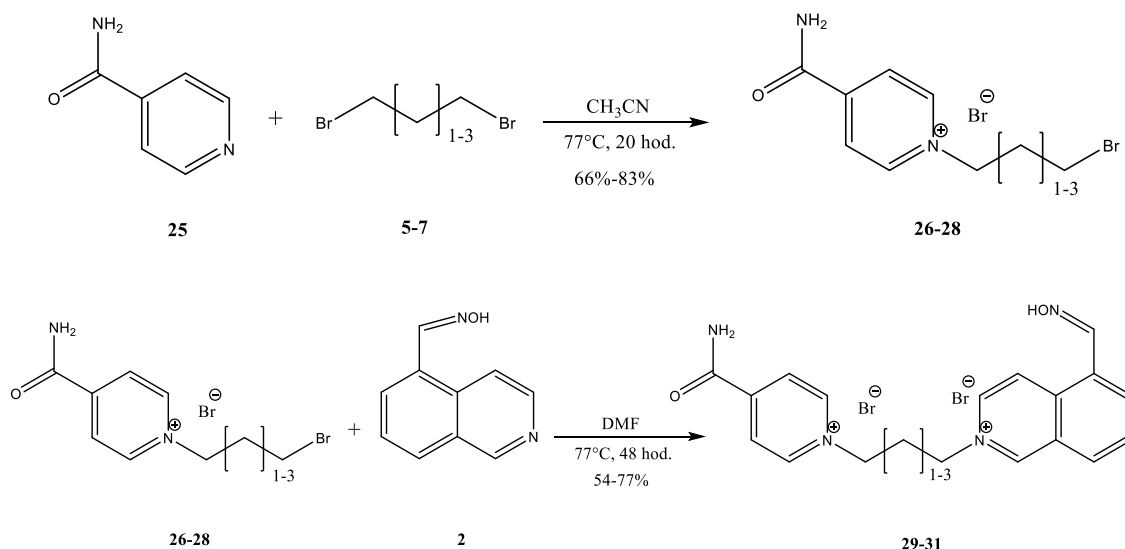


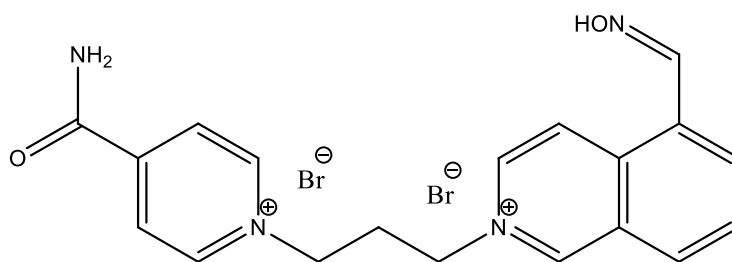
Schéma 7. Syntéza látok **29-31**

Postup:

K izonikotínamidu (**25**) (4,9 mmol) v prostredí aprotického rozpúšťadla acetonitrilu (11 ml) sme po rozpustení pridali nadbytok dibromderivát alkylového reťazca $\text{C}_3\text{-C}_5$ (**5-7**) (14,7 mmol), aby sme minimalizovali vznik bis-derivátu. Reakciu sme nechali prebiehať pri teplote 77°C , 20 hodín. Následne sme zmes vychladili na laboratórnu teplotu, prefiltrovali sme ju a premyli acetónom (20 ml), v ktorom je izonikotínamid na rozdiel od medziproduktu rozpustný. Priebeh reakcie a čistotu produktu sme pri syntéze kontrolovali pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze chloroform-metanol (1:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Následne bola totožnosť známych medziproduktov **26-28** ešte potvrdená ^1H a ^{13}C NMR analýzou. Medziprodukt sme vysušili a rozpustili v DMF (0,4ml). Následne sme k medziproduktu **26-28** (0,45 mmol) pridali oxim **2** (0,58 mmol) a zmes sme nechali reagovať pri teplote 77°C , 48 hodín. K reakčnej zmesi sme následne

pridali toluén a rozpúšťadlá azeotropicky odparili. Následne sme produkt znečistený východiskovou látkou nechali precipitovať z etanolu pri laboratórnej teplote 2 hodiny. Produkt sme prefiltrovali, premyli etanolom a vysušili. Priebeh reakcií a čistotu produktov sme kontrolovali pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze chloroform-metanol (1:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. ^1H a ^{13}C NMR spektrá boli merané pri laboratórnej teplote v DMSO.

3.4.1. 2-[3-(4-karbamoylpyridínium-1-yl)propyl]-5-[(hydroxyimino)metyl] izochinolín-2-ium dibrómid (29)



$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2\text{Br}_2$

Výtťažok: 77% (171 mg) biela kryštálická látka

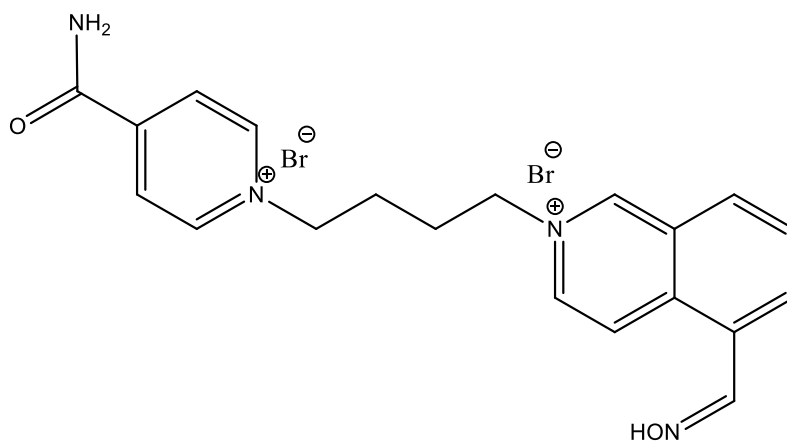
Cal.M(g.mol $^{-1}$) = 496,19570; Cal. [m/2z] = 168,0788; Exp. [m/2z] = 168,0785

Teplota topenia: 261,0 – 262,5°C

^1H NMR (DMSO, 500 MHz): δ 11,95 (s, 1H, NOH); 10,34 (s, 1H, ArH); 9,38 (d, 2H, $J = 6,8\text{Hz}$, 2 x ArH); 9,20 (d, 1H, $J = 7,1\text{Hz}$, ArH); 9,00 (d, 1H, $J = 7,2\text{Hz}$, ArH); 8,91 (s, 1H, CH=N); 8,74 (s, 1H, NH); 8,55 - 8,49 (m, 4H, 4 x ArH); 8,30 (s, 1H, NH); 8,14 - 8,10 (m, 1H, ArH); 4,94 - 4,88 (m, 4H, 2 x CH $_2$); 2,87 - 2,81 (m, 2H, CH $_2$)

^{13}C NMR (DMSO, 126 MHz): δ 163,1; 150,8; 148,1; 146,4; 145,9; 136,0; 135,6; 134,0; 131,5; 130,9; 129,0; 128,0; 125,9; 123,3; 57,4; 57,1; 31,3

3.4.2. 2-[4-(4-karbamoylpyridínium-1-yl)butyl]-5-[(hydroxyimino)metyl] izochinolín-2-ium dibrómid (30)



$C_{20}H_{22}N_4O_2Br_2$

Výtťažok: 54% (122 mg), biela kryštálická látka

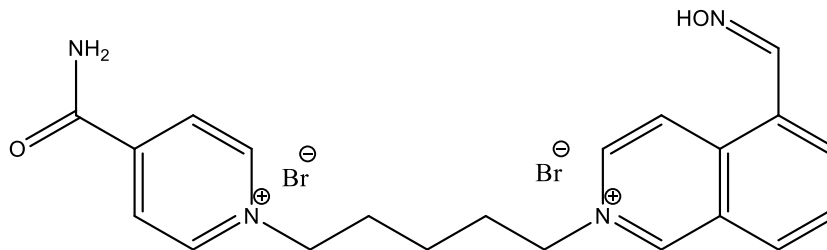
Cal.M(g.mol⁻¹) = 510,22228; Cal. [m/2z] = 175,0866; Exp. [m/2z] = 175,0865

Teplota topenia: 138,5 – 140,0 °C

¹H NMR (DMSO, 500 MHz): δ 11,95 (s, 1H, NOH); 10,32 (s, 1H, ArH); 9,34 (d, 2H, $J = 6,5\text{Hz}$, 2 x ArH); 9,17 (d, 1H, $J = 7,1\text{Hz}$, ArH); 8,97 (d, 1H, $J = 7,1\text{Hz}$, ArH); 8,89 (s, 1H, CH=N); 8,71 (s, 1H, NH); 8,53 - 8,46 (m, 4H, 4 x ArH); 8,28 (s, 1H, NH); 8,12 - 8,09 (m, 1H, ArH); 4,85 - 4,77 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,14 - 2,05 (m, 4H, 2 x CH₂)

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz): δ 163,2; 150,5; 148,0; 146,4; 145,7; 135,9; 135,5; 133,9; 131,4; 130,8; 129,0; 128,0; 125,8; 123,1; 59,8; 59,6; 27,0; 26,7

3.4.3. 2-[5-(4-karbamoylpyridínium-1-yl)pentyl]-5-[(hydroxyimino)metyl]izochinolín-2-ium dibrómid (31)



$C_{21}H_{24}N_4O_2Br_2$

Výt'azok: 71% (164 mg), žltá kryštalická látka

Cal.M(g.mol⁻¹) = 522,24886; Cal. [m/2z] = 182,0944; Exp. [m/2z] = 182,0942

Teplota topenia: 232,5 – 233,5°C

¹H NMR (DMSO, 500 MHz): δ 11,95 (s, 1H, NOH); 10,35 (s, 1H, ArH); 9,37 (d, 2H, J = 6,7Hz, 2 x ArH); 9,18 (d, 1H, J = 7,1Hz, ArH); 8,99 (d, 1H, J = 7,1Hz, ArH); 8,90 (s, 1H, CH=N); 8,72 (s, 1H, NH); 8,54 (d, 1H, J = 8,3Hz, ArH); 8,48 - 8,47 (m, 3H, 3 x ArH); 8,29 (s, 1H, NH); 8,13 - 8,09 (m, 1H, ArH); 4,79 - 4,70 (m, 4H, 2 x CH₂); 2,15 - 2,01 (m, 4H, 2 x CH₂) ; 1,41 - 1,35 (m, 2H, CH₂)

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz): δ 163,2; 150,4; 148,0; 146,4; 145,7; 135,9; 135,6; 133,8; 131,4; 130,8; 129,0; 127,9; 126,7; 123,2; 60,2; 60,0; 29,8; 29,4; 21,8

3.5. Príprava biskvartérnej izochinolínovej soli s oxapropylovým reťacom

Syntéza :

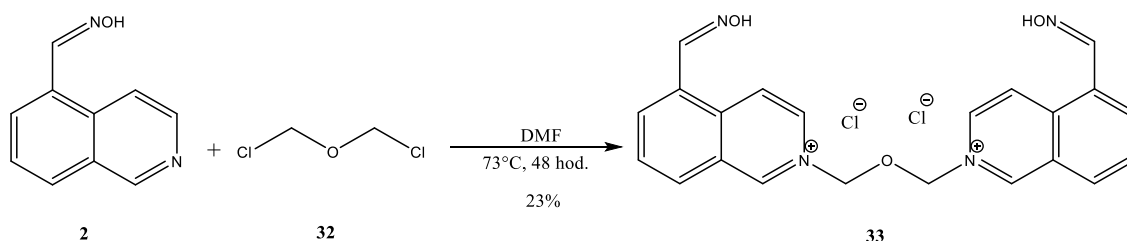
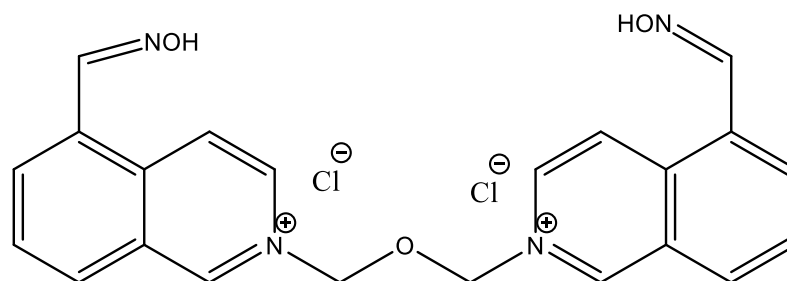


Schéma 8. Syntéza látky **33**

Postup:

K zmesi oximu **2** (100 mg, 0,58 mmol) v DMF (0,8 ml) sme pridali bis(chlormetyl)éter (**32**) (0,025 ml, 0,29 mmol). Reakciu sme nechali prebiehať pri teplote 73°C, 48 hodín. Následne sme reakčnú zmes nechali vychladiť, pridali sme toluén a rozpúšťadla sme odparili azeotropickou destiláciou na vákuovej odparke, kým sme nezískali surový produkt. Následne sme produkt precipitovali z etanolu a vákuovo prefiltrovali. Priebeh reakcií a čistotu jednotlivých produktov pri syntéze sme kontrolovali pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze chloroform-metanol (5:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. ¹H a ¹³C NMR spektrá pripravených zlúčenín boli merané pri laboratórnej teplote v DMSO.

3.5.1. 2,2'-[oxybis(metylén)]bis{5-[(hydroxyimino)metyl]izochinolín-2-ium} dichlóríd (33)



$C_{22}H_{20}N_4O_3Cl_2$

Výt'azok: 23% (60 mg), žltá kryštalická látka

Cal.M(g.mol⁻¹) = 459,32520; Cal. [m/2z] = 194,0762; Exp. [m/2z] = 194,0760

Teplota topenia: 182,5 – 184,5°C

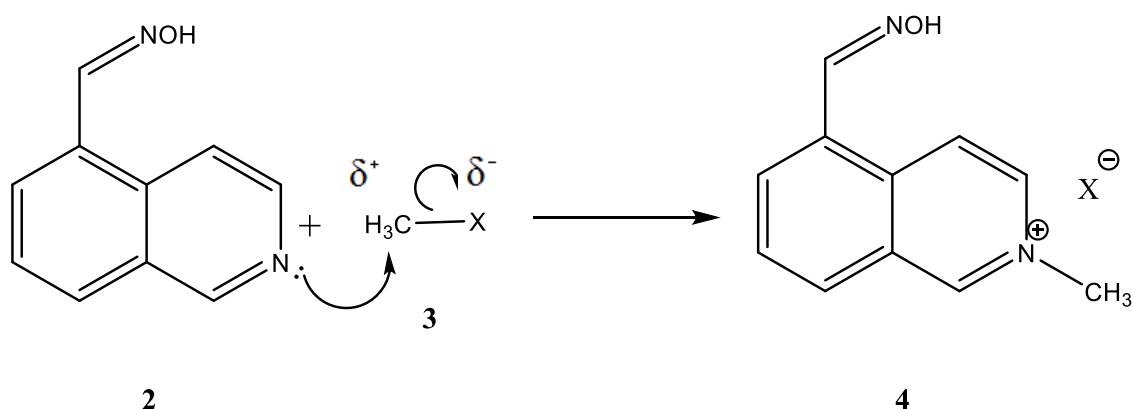
¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 10,27 (s, 2H, 2 x ArH); 9,41 (d, 2H, *J* = 7,1 Hz, 2 x ArH); 8,90 (d, 2H, *J* = 7,1 Hz, 2 x ArH); 8,72 (s, 2H, CH=N); 8,55 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, 2 x ArH); 8,46 (d, 2H, *J* = 6,8 Hz, 2 x ArH); 8,14 - 8,11 (m, 2H, 2 x ArH); 6,50 (s, 4H, 2 x CH₂)

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 151,5; 148,0; 139,7; 137,1; 134,9; 133,3; 132,8; 131,5; 129,8; 126,0; 88,4

4. DISKUSIA A VÝSLEDKY

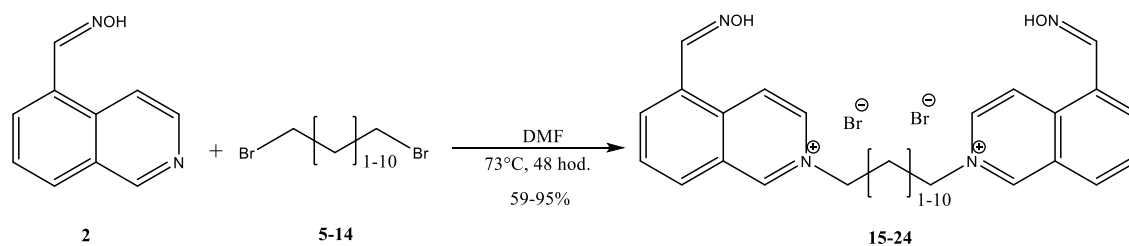
V prvom kroku syntézy bola pripravená molekula izochinolín-5-oximu (**2**) adično-eliminačnou reakciou v prostredí etanolu. Reakcia prebieha spontánne pri laboratórnej teplote. Na separáciu oximu **2** od východiskového aldehydu **1** sa použila stĺpcová chromatografia pre blízku polaritu látok a aj kvôli vyššej výťažnosti oproti kryštalizácii. Mobilnou fázou bol heptan-etylacetát (1:1), z ktorej sa nepolárnejší produkt eluoval ako prvý. Totožnosť oximovej skupiny sa preukázala ^1H NMR analýzou a to signálom tejto skupiny pri δ 11,61 (s, 1H).

V ďalšom kroku bola pripravená monokvartérna soľ **4** v prostredí etanolu mechanizmom bimolekulárnej nukleofilnej substitúcie $\text{S}_{\text{N}}2$ (Obr. 11). Predlohou syntézou bola syntéza štúdie Blagg a kol. (Blagg 1986)



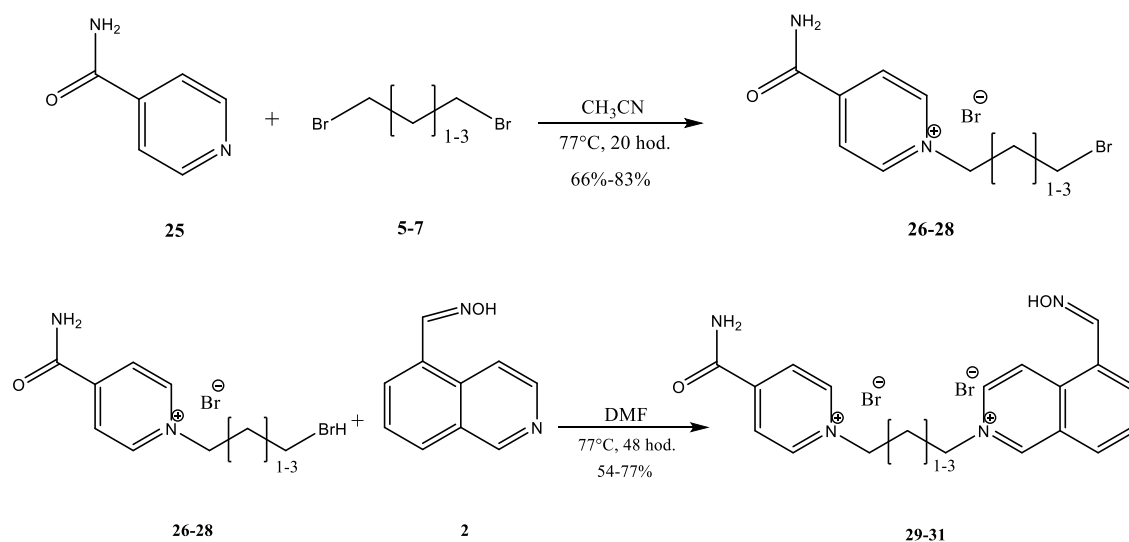
Obr. 10. Schéma prípravy monokvartérnej soli **4**

Predlohou pre syntézy biskvartérnych izochinolínových solí bola štúdia Srinivas a kol. (Srinivas 2006) Reakcia prebiehala v prostredí polárneho aprotického rozpúšťadla, ktoré podporuje priebeh $\text{S}_{\text{N}}2$ reakcie (DMF) a s dvojnásobným prebytkom východiskového oximu **2** sa zaistil vznik biskvartérnej soli. Aj pri týchto podmienkach však vznikla monokvartérna soľ ako vedľajší produkt, preto následne sa hlavný produkt (**15-24**) precipitoval z acetónu, v ktorom na rozdiel od vedľajšieho produktu je takmer nerozpustný. Pripravili sa biskvartérne deriváty s propylovým až dodecylovým reťazcom **15-24** (Obr. 11); príprava metylového a etylového reťazca nebola možná, pravdepodobne kvôli sterickým vplyvom jadier aromátu.



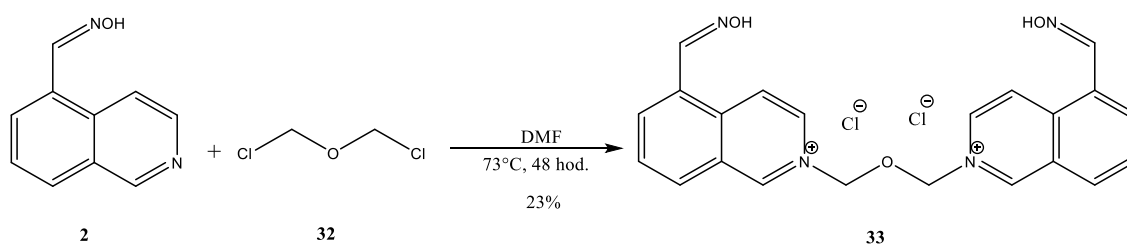
Obr. 11. Príprava biskvartérnych solí **15-24**

Ďalšou syntézou boli pripravené biskvartérne izochinolínovo-izonikotínamidové soli **29-31** (Obr. 12). V prvom kroku sa pripraví monokvartérna izonikotínová soľ (**26-28**) v značnom nadbytku dibromovaného reťazca (**5-7**) (3:1), aby sa zabezpečil vznik monoderivátu. Reakcia prebieha pri zvýšenej teplote v prostredí acetonitrilu. Medziprodukt sa premyje 20 ml acetónu a vysuší. Medziprodukt (monokvartérna soľ) (**26-28**) následne reaguje s východiskovým oximom **2** za zvýšenej teploty v prostredí polárneho aprotického rozpúšťadla za vzniku biskvartérnych izochinolínovo-izonikotínamidových derivátov, ktoré sa následne precipitujú z etanolu, v ktorom sú monokvartérna soľ a oxim rozpustné.



Obr. 12. Príprava biskvartérnych izochinolínovo-izonikotínamidových solí **29-31**

Ako posledný bol pripravený derivát biskvartérnej izochinolínovej soli s oxopropylovým reťazcom (Obr. 13). K zmesi oximu **2** v prostredí polárneho aprotického rozpúšťadla sa pridá bis(chlormetyl)éter (**32**). Reakcia prebieha za zvýšenej teploty 48 hodín. Následne sa reakčná zmes vychladí a rozpúšťadlá sa odparia azeotropickou destiláciou. Následne sa produkt precipituje z etanolu, prefiltruje a vysuší.



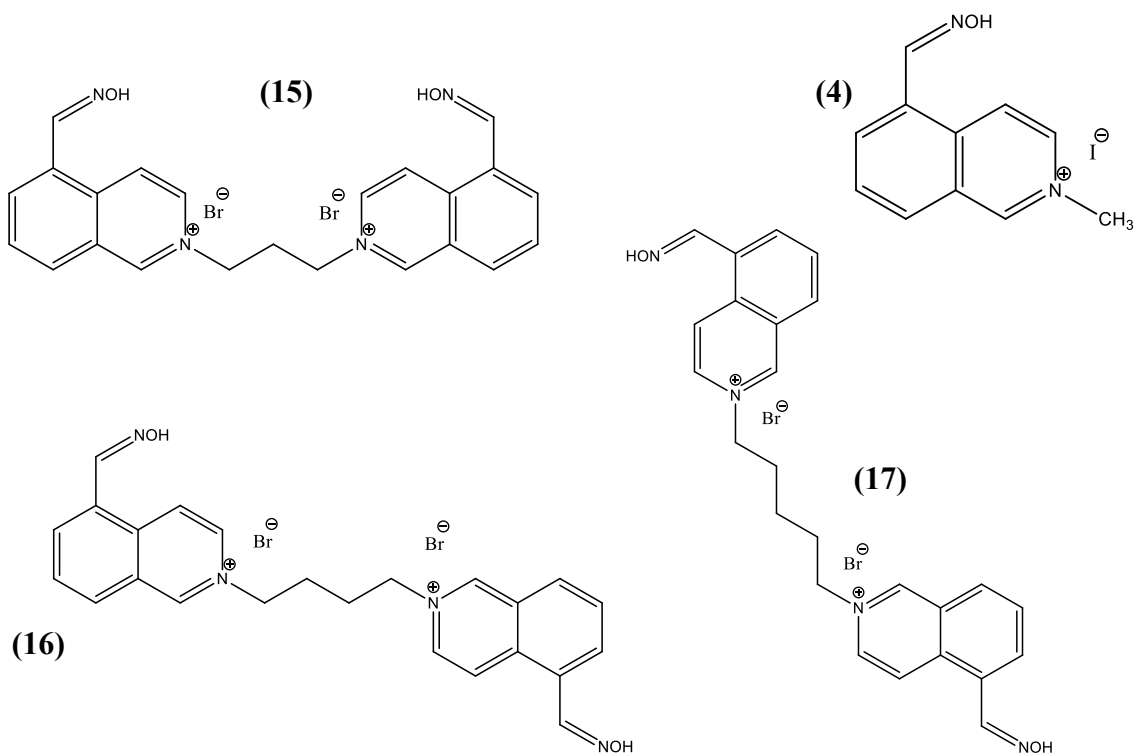
Obr. 13. Príprava soli s oxopropylovým reťazcom **33**

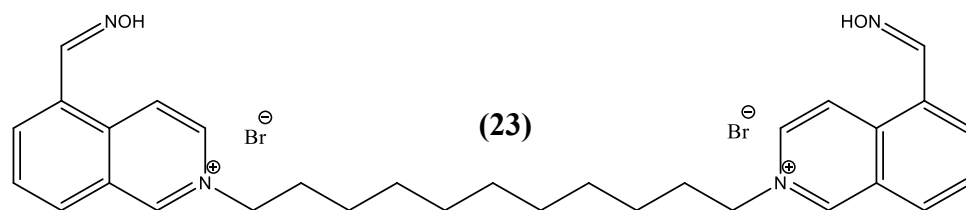
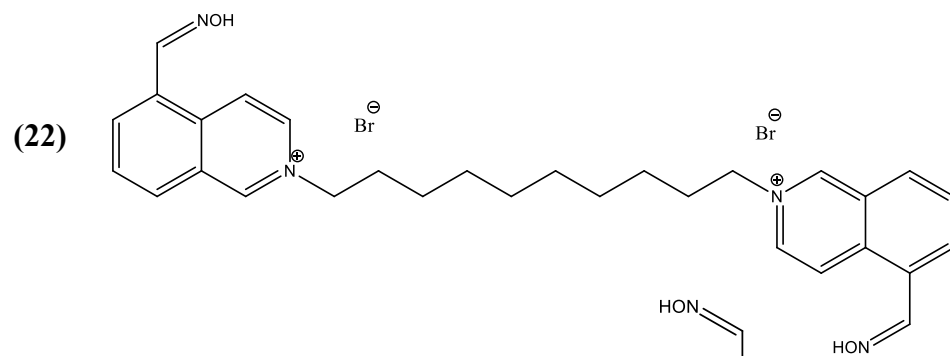
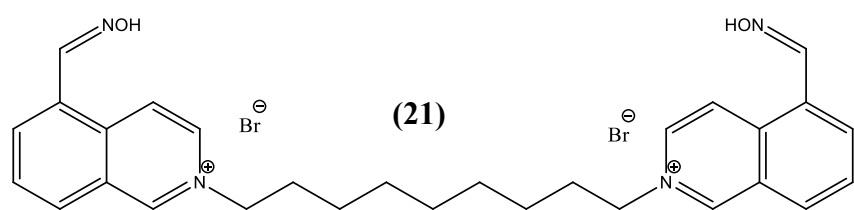
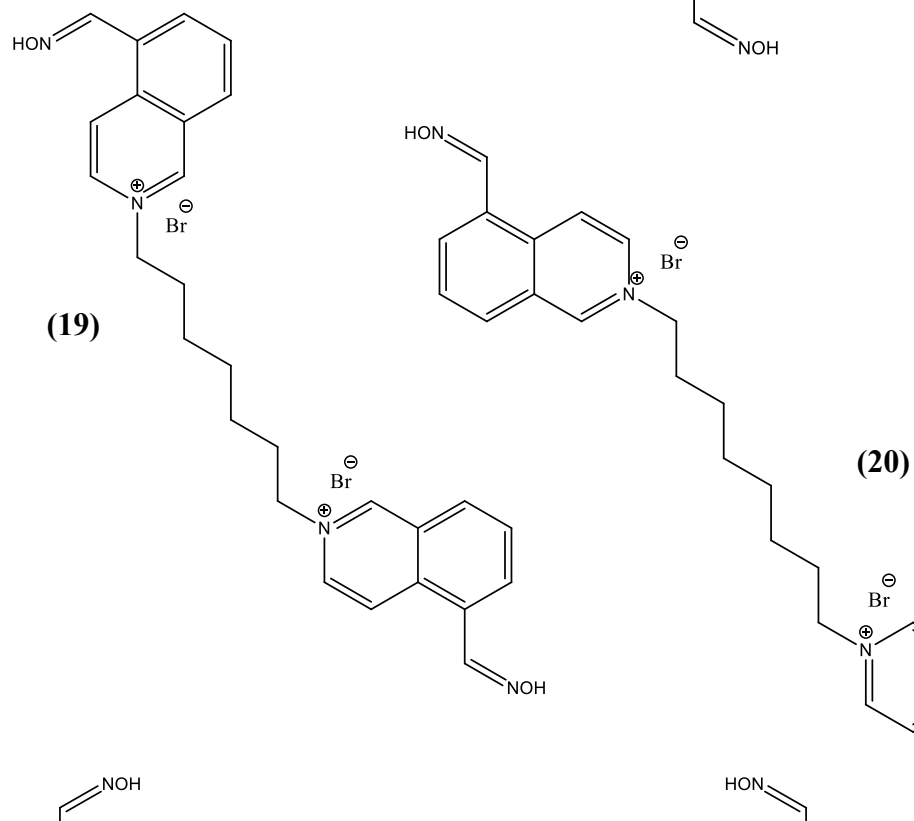
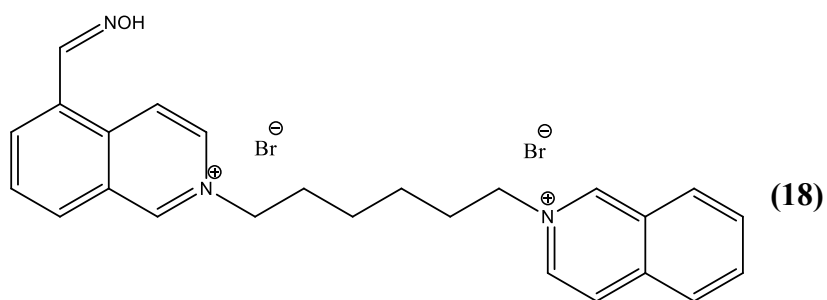
Štruktúry všetkých produktov boli potvrdené na základe ¹H, ¹³C NMR a HRMS analýzy a u jednotlivých derivátoch bola stanovená ich teplota topenia.

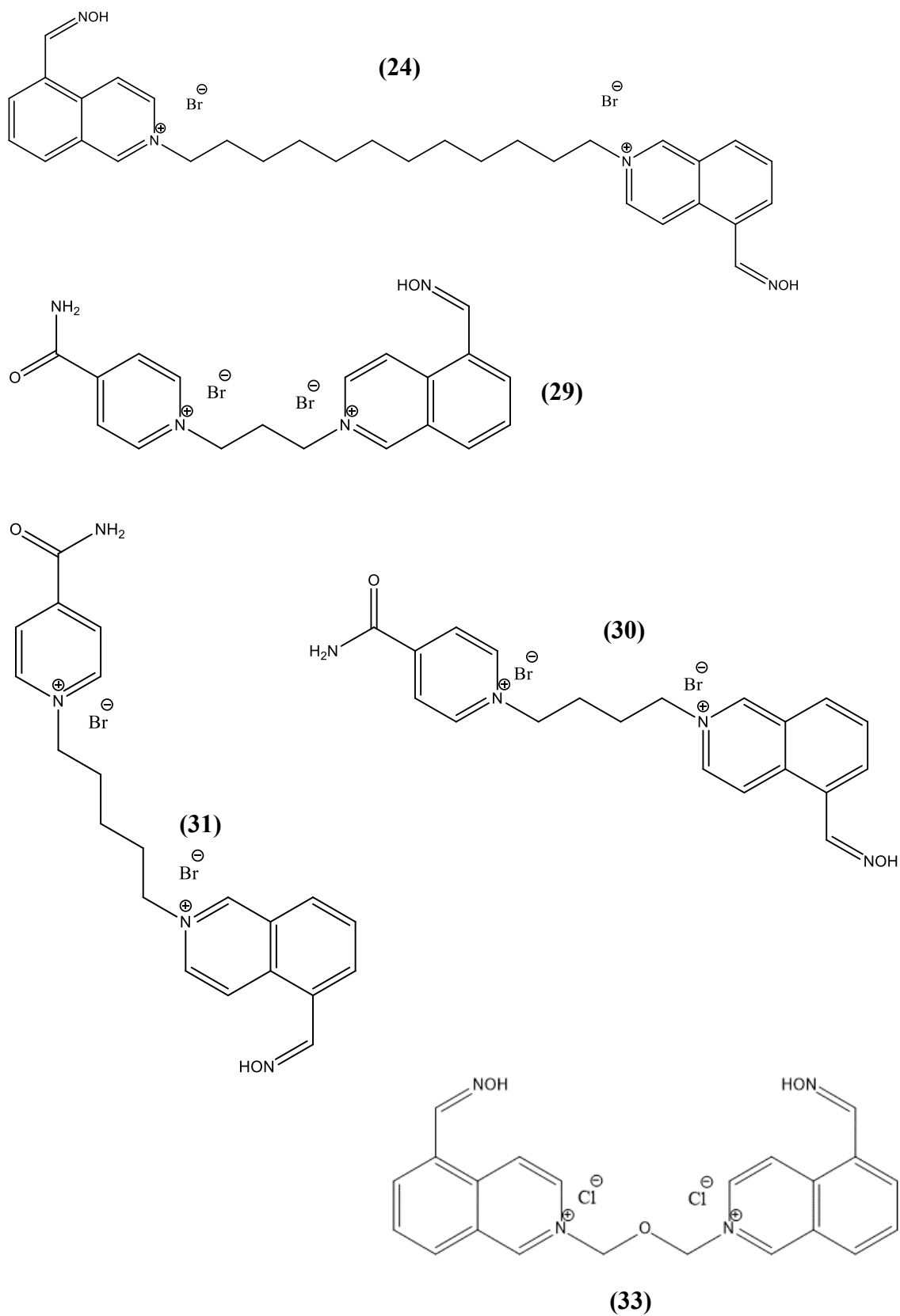
5. ZÁVER

V tejto diplomovej práci som zhrnula všeobecné poznatky o acetylcholíne, jeho význame a účinku na jednotlivých typoch receptorov parasympatického nervového systému. Podrobnejšie som popísala štruktúru a mechanizmus funkcie acetylcholínerázy a účinok ireverzibilných blokátorov – organofosfátov. Ďalej som popísala štruktúru, vlastnosti a toxicitu organofosfátov ako aj liečbu pri intoxikácii. Rozobrala som účinnosť, vlastnosti a použitie známych reaktivátorov acetylcholínerázy ako aj ich obmedzenia a potrebu ďalšieho výskumu.

Ciele práce boli splnené. Pripravila som látku izochinolín-5-oxim (**2**), ktorá slúžila ako východisková látka ďalších syntéz konečných oximových produktov. Následne som pripravila a popísala syntézy 15 finálnych produktov (Obr. 14), monokvartérnej izochinolínolínovej soli **4**, biskvartérnych izochinolínolínových solí **15-24**, biskvartérnych izochinolínovo-izonikotínamidových solí **29-31** a biskvartérnej izochinolínovej soli s oxapropylovým reťazcom **33**. Štruktúry týchto látok som potvrdila ^1H , ^{13}C NMR a HRMS analýzou, a u jednotlivých derivátov som stanovila ich teploty topenia. Látky boli pripravené ako potencionálne reaktivátory acetylcholínerázy inhibovanej organofosfátmi a budú poskytnuté k ďalšiemu biologickému testovaniu.







Obr. 14. Štruktúry pripravených zlúčenín

6. ZOZNAM OBRÁZKOV A SCHÉM

- Obr.1. Štruktúra trimedoximu a izochinolínového analógu
- Obr. 2. Štruktúra acetylcholínu
- Obr. 3. Štruktúra acetylcholinesterázy (Zhou 2010)
- Obr. 4. Štiepenie acetylcholínu enzýmom acetylcholinesterázou
- Obr. 5. Všeobecný vzorec organofosfátov
- Obr. 6. Štruktúra fosfátu / fosfonátu
- Obr. 7. Štruktúry organofosfátov
- Obr. 8. Štruktúry známych reaktivátorov acetylcholinesterázy
- Obr. 9. ^1H a ^{13}C MNR spektrum oximu **2**
- Obr. 10. Schéma prípravy monokvartérnej soli **4**
- Obr. 11. Príprava biskvartérnych solí **15-24**
- Obr. 12. Príprava biskvartérnych izochinolínovo-izonikotínamidových solí **29-31**
- Obr. 13. Príprava soli s oxopropylovým reťazcom **33**
- Obr. 14. Štruktúry pripravených zlúčenín

- Schéma 1. Proces inhibície acetylcholinesterázy
- Schéma 2. Reaktivácia acetylcholinesterázy
- Schéma 3. Syntéza východiskovej látky **2**
- Schéma 4. Adično-eliminačný mechanizmus prípravy oximu **2**
- Schéma 5. Syntéza látky **4**
- Schéma 6. Syntéza derivátov **15-24**
- Schéma 7. Syntéza látok **29-31**
- Schéma 8. Syntéza látky **33**

7. ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1. Porovnanie toxicity (LD_{50}) rôznych organofosfátov

8. ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholinesteráza
acetyl-CoA	acetylkoenzým A
Ala	alanín
BuChE	butyrylcholinesteráza, pseudocholinesteráza
CT	čas nástupu kŕčov (convulsion time)
DAG	diacylglycerol
DDT	dichlórdifenyltrichlóretán
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
GABA	kyselina gama-amino maslová
Gly	glycín
Glu	glutámová kyselina
HEB	hematoencefalická bariéra
His	histidín
HRMS	hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením
i.m.	intramuskulárne
i.p.	intrapulmonálne
IP ₃	inozitoltrifosfát
i.v.	intravenózne
LT	čas smti (lethal time)
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
OP	organofosfáty
OPIDN	organofosfátmi indukovaná oneskorená neurotoxicita
p.c.	perkutánne
PIPP/PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PLC β	fosfolipáza C β
p.o.	perorálne
PR	ochranný koeficient (protective ratio)
s.c.	subkutánne

Ser	serín
TLC	tenkovrstvová chromatografia
Trp	tryptofán
Tyr	tyrozín
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia

9. POUŽITÁ LITERATÚRA

ALDRIDGE, W.N.: Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues., *Biochemical Journal*, 1950, 46.4: 451.

BAJGAR, J.: Organophosphates / Nerve Agent Poisoning: Mechanism of Action, Diagnosis, Prophylaxis, And Treatment., *Advances in clinical chemistry*, 2004, 38: 151-216.

BAJGAR, J., et al.: Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2007, 7.5: 461-466.

BLAGG, J., et al.: Tetrahydroisoquinolines. Part 2. Synthesis of 4-substituted N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines via regio-and stereo-selective elaboration of tricarbonyl(N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline)chromium., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1986, 2257-2261.

BIEGER, D., WASSERMANN, O.: Ionization constants of cholinesterase- reactivating bispyridinium aldoximes., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1967, 19.12: 844-847.

ČOLOVIĆ, M.B., et al.: Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology., *Current neuropharmacology*, 2013, 11.3: 315-335.

COSTA, L.G.: Current issues in organophosphate toxicology., *Clinica chimica acta*, 2006, 366.1: 1-13.

DANNENBERG, A., PEHKONEN, S.O.: Investigation of the heterogeneously catalyzed hydrolysis of organophosphorus pesticides., *Journal of agricultural and food chemistry*, 1998, 46.1: 325-334.

DOLEŽAL, M., a kol.: *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém.*, 1. vydání Praha: Nakladatelství Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1633-9.

GORECKI, L., et al.: SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides., *Archives of toxicology*, 2016, 90.12: 2831-2859.

GREENE, S.A., POHANISH, R.P.: *Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals*, New York: William Andrew Publishing, 2005. ISBN: 978-14-557-3148-0

GUPTA, R.C. (ed.). *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds.* , Academic Press, 2011. ISBN: 978-0-12-0088523-7

CHOWDHARY, S., BHATTACHARYYA, R., BANERJEE, D.: Acute organophosphorus poisoning., *Clinica chimica acta*, 2014, 431: 66-76.

JOKANOVIĆ, M.: Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides., *Toxicology letters*, 2009, 190.2: 107-115.

KASSA, J.: Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents., *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 2002, 40.6: 803-816.

KORABECNY, J., et al.: From pyridinium-based to centrally active acetylcholinesterase reactivators., *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2014, 14.3: 215-221.

KUCA, K., PATOCKA, J., CABAL, J.: Reactivation of organophosphate inhibited acetylcholinesterase activity by α , ω -bis-(4-hydroxyiminomethylpyridinium) alkanes in vitro., *J Appl Biomed*, 2003, 1: 207-11.

MARTÍNKOVÁ J. a kol.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických odborů*, Praha: Grada Publishing, 2007. ISBN: 978-80-247-1356-4,

MLADĚNKA, P.: *VNS - seminár* [přednáška k předmětu Farmakologie, obor Farmacie, FaF HK UK v Praze]. Hradec Králové. 2015

MUSILEK, K., et al.: Progress in antidotes (acetylcholinesterase reactivators) against organophosphorus pesticides. In: *Pesticides in the Modern World-Effects of Pesticides Exposure.*, InTech, 2011.

NACHMANSOHN, D., WILSON, I.B.: *The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine.*, John Wiley & Sons, Inc, 2009.

POPE, C., KARANTH, S., LIU, J.: Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action., *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005, 19.3: 433-446.

ROMANO JR, J.A., et al. (ed.): *Chemical warfare agents: chemistry, pharmacology, toxicology, and therapeutics.*, Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN: 978-1-4200-4662-5

PATOCKA, J., et al.: Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics., *J Appl Biomed*, 2005, 3: 91-99.

PATOCKA J. a kol.: *Vojenská toxikologie*, 1.vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN: 978-80-247-0608-5

SAGE W.W., HOFFMAN R.S.: Nerve Agents: A Comprehensive Review., *Journal of Intensive Care Medicine*, 2004, 19(1): 22-37.

SCHMIDT, R.F., LANG, F., THEWS, G.: *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie.*, Berlin: Springer, 2004. ISBN 3-540-21882-3

SHIH, T-M.: Comparison of several oximes on reactivation of soman-inhibited blood, brain and tissue cholinesterase activity in rats., *Archives of toxicology*, 1993, 67.9: 637-646.

SIDELL R.F., MARRS, T.T., MAYNARD, R.L. (ed.): *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*, John Wiley & Sons, 2007, ISBN: 978-0-470-01359-5

SIDELL, F.R.; GROFF, W.A.: Toxogonin: blood levels and side effects after intramuscular administration in man., *Journal of pharmaceutical sciences*, 1970, 59.6: 793-797.

SRINIVAS R. 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.

SUSSMAN, J.L., et al.: Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein., *Science*, 1991, 253.5022: 872.

ŠEPSOVÁ, V.: *Testování inhibičního potenciálu reaktivátorů lidské acetylcholinesterasy in vitro.*, katedra farmakologie a toxikologie, 2011. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové.

TAYLOR, P., RADIC, Z.: The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 1994, 34.1: 281-320.

VOPRŠALOVÁ, M., ŽÁČKOVÁ P.: *Základy toxikologie pro farmaceuty.*, 1. vydání. Praha : Karolinum, 2000. ISBN 80-7184-282-6

ZHOU, Y., WANG, S., ZHANG, Y.: Catalytic Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase Determined by Born– Oppenheimer Ab Initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations., *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114.26: 8817-8825.