

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**



**Vztah mezi strukturou a účinností potenciálních  
reaktivátorů acetylcholinesterasy I**

Diplomová práce

Hradec Králové 2008

Ondřej Holas

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

V Hradci Králové 31.1.2008

.....  
podpis

Děkuji Doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. za odborné vedení při vypracovávání práce a Mgr. Kamilu Musílkovi, Ph.D. za cenné rady a nezištnou pomoc při realizaci zadaných úkolů.

## Souhrn

### **Vztah mezi strukturou a účinností potenciálních reaktivátorů acetylcholinesterasy**

Organofosforové sloučeniny (OF) se používají jako pesticidy v zemědělství a v průmyslu jako inhibitory hoření či změkčovadla. Pro vojenské účely byly vyvinuty nervově paralytické látky (NPL, př. tabun, sarin, soman, VX). Jejich toxický účinek je založen na fosforylaci resp. fosfonylaci aktivního místa enzymu, kde se kovalentně váží na serinový hydroxyl (Ser200) aktivního místa acetylcholinesterasy (AChE). Současná standardní léčba při intoxikacích OF se skládá z podání oximových reaktivátorů ve spojení s anticholinergním léčivem (přednostně atropinem). Žádný z dosud známých reaktivátorů však není schopen uspokojivě reaktivovat AChE inhibovanou všemi typy OF. Cílem naší práce byla studie vztahů mezi strukturou a aktivitou nových reaktivátorů AChE proti intoxikaci paraoxonem *in vitro* a jejich srovnání se sloučeninami v současnosti dostupnými. Pro vyhodnocení reaktivace byl zvolen standardní *in vitro* test s použitím homogenátu potkaního mozku.

## Summary

### **The relationship between structure and activity of potential reactivators of acetylcholinesterase**

Organophosphorus compounds (OPC) are used as agricultural pesticides and in industry as fire retardants or plasticizers. For military use there have been developed nerve agents (NA, e.g. tabun, sarin, soman, VX). The toxicity of these compounds is based upon phosphorylation or phosphonylation at the serine hydroxy group (Ser200) of the active site of the acetylcholinesterase. The current standard treatment consists of administration of oxime reactivators in combination with anticholinergic drug (preferably atropine). Unfortunately, none of the currently used oximes is sufficiently effective against all types of the OPCs. The aim of this study is determination of the relationship between structure and activity of new reactivators against paraoxon-inhibited AChE *in vitro* and comparison with currently available substances. For evaluation of reactivation activity, a standard *in vitro* test using rat brain homogenate has been chosen.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod a cíl práce.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Acetylcholin .....</b>	<b>10</b>
2.1.1	Fyziologická funkce acetylcholinu .....	10
2.1.2	Syntéza a transport acetylcholinu .....	10
<b>2.2</b>	<b>Receptory acetylcholinu .....</b>	<b>11</b>
2.2.1	Nikotinové receptory .....	11
2.2.2	Muskarinové receptory .....	12
<b>2.3</b>	<b>Cholinesterasy .....</b>	<b>14</b>
2.3.1	Fyziologická funkce cholinesteras.....	14
2.3.2	Butyrylcholinesterasa.....	14
2.3.3	Acetylcholinesterasa .....	14
2.3.3.1	Fyziologická funkce acetylcholinesterasy .....	14
2.3.3.2	Molekulární struktura acetylcholinesterasy .....	15
<b>2.4</b>	<b>Inhibitory acetylcholinesterasy.....</b>	<b>17</b>
2.4.1	Reverzibilní inhibitory .....	17
2.4.2	Ireverzibilní inhibitory .....	17
2.4.2.1	Nervově paralytické látky .....	18
2.4.2.2	Organofosfátové pesticidy a insekticidy.....	18
2.4.2.3	Mechanismus inhibice .....	19
2.4.2.4	Klinický obraz akutní otravy OF .....	20
2.4.2.5	Pozdní neurologický efekt .....	20
<b>2.5</b>	<b>Profylaxe otrav OF .....</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Terapie otrav OF .....</b>	<b>23</b>

2.6.1	Reaktivátory acetylcholinesterasy .....	24
<b>3</b>	<b><i>Experimentální část</i></b> .....	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>25</b>
3.1.1	Princip testování .....	25
3.1.2	Chemikálie a přístroje .....	25
3.1.3	Metoda měření .....	26
<b>3.2</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Diskuse</b> .....	<b>31</b>
3.3.1	Přítomnost oximové skupiny .....	32
3.3.2	Počet oximových skupin .....	32
3.3.3	Poloha oximové skupiny .....	33
3.3.4	Přítomnost kvarterního dusíku .....	34
3.3.5	Počet kvarterních dusíků .....	34
3.3.6	Délka spojovacího řetězce .....	35
3.3.7	Přítomnost $\pi$ elektronů ve struktuře spojovacího řetězce .....	35
3.3.8	Přítomnost jiných strukturních motivů .....	36
<b>4</b>	<b><i>Závěr</i></b> .....	<b>38</b>
<b>5</b>	<b><i>Přílohy</i></b> .....	<b>39</b>
<b>6</b>	<b><i>Literatura</i></b> .....	<b>44</b>

## Seznam zkratek

ACh- acetylcholin

AChE- acetylcholinesterasa

BuChE- butrylcholinesterasa

CNS- centrální nervový systém

VACHT- vesikulární acetylcholinový transportér

MACHR- muskarinové acetylcholinové receptory

NACHR- nikotinové acetylcholinové receptory

CAMP- cyklický adenosinmonofosfát

IP<sub>3</sub>- inositoltrifosfát

Ser- serin

His- histidin

Glu- glutammová kyselina

Tyr- tyrosin

Trp- tryptofan

Asp- asparagová kyselina

OF- organofosforečné sloučeniny

Cys- cystein

NPL- nervově paralytické látky

GA- tabun

GF- cyklosarin

GD- soman

GB- sarin

PNE- pozdní neurologický efekt

2-PAM- pralidoxim

TMB-4- trimedoxim

MMC-4- metoxim

# 1 Úvod a cíl práce

Jedním z trendů při vývoji nových léčiv je snaha o ovlivnění činnosti nervového systému pomocí zásahu do syntézy, transportu nebo odbourávání neurotransmiterů. Fakt, že přenos signálu mezi jednotlivými nervovými buňkami se děje především za účasti těchto sloučenin, je důvodem, proč tato oblast prochází dynamickým vývojem.

Acetylcholin je jedním z hlavních neurotransmiterů nervového systému a jeho role je nejvýznamnější v parasympatické části vegetativního nervstva. Narušení rovnováhy mezi působením a odbouráváním acetylcholinu bylo popsáno u mnoha různých onemocnění. Jako příklady mohou sloužit např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba nebo Myasthenia gravis. Sloučeniny, které ovlivňují působení acetylcholinu, nazýváme cholinolytika v případě, kdy se intenzita působení acetylcholinu snižuje a cholinomimetika, kdy dochází ke zvyšování intenzity cholinergního působení.

Cholinomimetika lze dále rozlišit na přímá, která podobně jako acetylcholin stimulují přímo cholinergní receptory. Nepřímá cholinomimetika působí inhibicí enzymů odbourávajících acetylcholin (zejména acetylcholinesterasy) a zvyšují tak dostupnost neurotransmiteru pro nervová zakončení. Inhibitory acetylcholinesterasy mohou kompetitivně (stericky) blokovat aktivní místo nebo esterifikovat serin v aktivním místě enzymu. Druhá skupina je podstatně rozsáhlejší a zajímavější. Alkaloid fyzostigmin jako reversibilní inhibitor přispěl k objasnění podstaty funkce nepřímých cholinomimetik a jeho polosyntetické deriváty se používají k terapii řady onemocnění.

Vedle těchto sloučenin byly ve 30. letech vyvinuty organofosforové inhibitory acetylcholinesterasy. Výzkum organofosfátů probíhal v oblasti insekticidů a pesticidů, které se používají dodnes zejména v rozvojových státech kvůli své nízké ceně. Paralelně s tím byly vyvinuty nervově paralytické látky, které měly sloužit vojenským účelům a jsou vysoce toxické.

S ohledem na nebezpečnost těchto sloučenin vznikla potřeba vyvinout účinnou antidotní terapii. V dnešní době se používá kombinace cholinolytik (anticholinergik) s reaktivátory acetylcholinesterasy. Anticholinergika se označují jako funkční antidota a brání nadměrnému dráždění nahromaděným acetylcholinem. Reaktivátory označujeme



jako antidota kauzální a jsou schopné do určité míry obnovit funkci acetylcholinesterasy.

Nicméně se dosud nepodařilo nalézt vhodný reaktivátor, který by byl schopen reaktivovat enzym inhibovaný všemi typy organofosfátů. Vzhledem k tomu, že v dnešní době používané reaktivátory byly vyvinuty hlavně pro případy otravy nervově paralytickými látkami, je jejich účinnost proti pesticidům a insekticidům velice nízká.

Potřeba vývoje nových reaktivátorů AChE je zřejmá. Sloučeniny, které se dnes k tomuto účelu využívají nejsou dostatečně efektivní proti všem typům organofosfátů a nebezpečí teroristického útoku nebo zamoření zdrojů pitné vody je stále aktuální.

Cílem této práce byl screening reaktivační účinnosti několika sérií oximových reaktivátorů proti paraoxonem inhibované AChE. Reaktivátory byly připraveny na Katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany. Následovalo studium závislosti mezi strukturou a účinností. Připravené reaktivátory byly srovnávány s komerčně dostupnými reaktivátory.

## **2 Teoretická část**

### **2.1 Acetylcholin**

#### **2.1.1 Fyziologická funkce acetylcholinu**

Acetylcholin (ACh) je neurotransmiterem centrálního oddílu vegetativního nervového systému, periferního oddílu parasympatické části vegetativního nervstva, motorických neuronů, a je to také fyziologický transmitter na nervosvalové ploténce. Také je bohatě zastoupen v mnoha drahách centrálního nervového systému (CNS).<sup>1</sup>

#### **2.1.2 Syntéza a transport acetylcholinu**

Chemicky je ACh ester bazického alkoholu cholinu a kyseliny octové. Syntéza ACh probíhá v presynaptických neuronech. Acetylace cholinu acetylcoenzymem-A je katalyzována enzymem cholinacetyltransferasou. Tato syntéza byla plně objasněna a popsána a probíhá totožně u obratlovců i bezobratlých.<sup>2</sup>

Do vesikul může být syntetizovaný ACh transportován aktivně pomocí vesikulárního acetylcholinového transportéru (VACHT). VACHT je transmembránový protein, který je složen z 12 transmembránových domén. Případně se do vesikul transportuje po gradientu pH, který je vytvářen ATP-depedentní protonovou pumpou, která acidifikuje lumen vesikul. Následná fúze acetylcholinových vesikul se synaptickou membránou je vápenatými ionty stimulovaný proces. Po influxu  $\text{Ca}^{2+}$  do nitra buňky dojde ke splynutí vesikul se synaptickou štěrbinou a difúzi ACh do synaptického prostoru.<sup>2</sup>

## 2.2 Receptory acetylcholinu

Receptory ACh se dají rozdělit podle jejich agonismu na nikotinové (nAChR) a muskarinové receptory (mAChR).<sup>1</sup>

### 2.2.1 Nikotinové receptory

nAChR jsou základní molekulou pro přenos nervového vzruchu v CNS i mimo něj, byly identifikovány jako základní elementy pro udržení vědomí, učení, pozornosti, paměti a figurují v řadě mozkových drah. Jejich nefunkčnost, poškození, nebo změna může mít za následek poruchy typu Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby, nebo Schizofrenie. Proto se nAChR staly cílovou strukturou pro celou řadu léčiv.<sup>3</sup>

nAChR patří do velké rodiny ligandem řízených iontových kanálů. nAChR rozlišujeme na dva základní typy, neuronální a muskulární. Neuronální nAChR jsou hojně zastoupeny v CNS a vegetativních gangliích. Každý receptor se skládá z pěti podjednotek (dvěma  $\alpha$ , jednou  $\beta$ ,  $\delta$  a  $\gamma$ , která je v embryonálním stádiu nahrazena podjednotkou  $\epsilon$ ), které obklopují hydrofilní kationický kanál.<sup>1,4,5</sup>

Receptor se skládá ze tří domén: extracelulární, transmembránové a nejmenší intracelulární. Vazebná místa pro ACh jsou součástí extracelulární domény, která tvoří na povrchu strukturu o velikosti přibližně 160 Å (1600 nm). Transmembránový kanál je součástí transmembránové domény. Intracelulární doména tvoří bránu, kterou ústí kationický kanál do nitra buňky.<sup>3,6</sup>

Po navázání agonistů (obvykle jsou dva) na vazebné místo receptoru dojde ke konformačním změnám podjednotek, tím k otevření kationového kanálu a influxu kationů do nitra buňky. Vstup iontů do buňky s ohledem na proporcionální zastoupení kalciových iontů je dán typem podjednotek tvořících receptor. Pro příklad podjednotka  $\alpha 7$  zastoupená v nAChR znamená, že tento iontový kanál bude propouštět proporcionálně největší množství kalciových iontů do buňky.<sup>4,7</sup>

## 2.2.2 Muskarinové receptory

Muskarinové acetylcholinové receptory (mAChR) jsou rozdílné od nAChR lokalizovány zejména na efektorových orgánech. Kontrolují činnost hladké svaloviny, sekreci některých žláz nebo frekvenci a sílu srdeční činnosti. V CNS jsou mAChR zastoupeny také. Jejich činnost je spojena s kontrolou motoriky, termoregulací, nebo pamětí. Podobně jako je tomu v případě nAChR jsou mAChR rovněž cílovou strukturou pro řadu léčiv zaměřujících se na choroby jako je Alzheimerova choroba nebo Parkinsonova choroba.<sup>1</sup>

mAChR mají jiný mechanismus účinku než nAChR. Jde o příklad receptoru spojeného s G-proteinem. Receptor je peptid, který jako helix sedmkrát prochází buněčnou membránou a extracelulárně vytváří prohlubeň pro navázání substrátu. Po navázání substrátu dojde k dosud neznámým konformačním změnám. Ty vedou k aktivaci plazma-lamelárně lokalizovaného G-proteinu, z něj se odštěpí  $\alpha$  podjednotka, jejíž součástí je i guanosindifosfát, který se poté fosforyluje. Odštěpená a fosforylovaná  $\alpha$  podjednotka difunduje k efektorovým proteinům. Nejdůležitější efektor je adenylátcyklasa a fosfolipasa C. Produktem adenylátcyklasy je cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), který funguje v cytosolu jako messenger a aktivuje např. důležitý enzym proteinkinasu A, která fosforyluje řadu důležitých enzymů a moduluje tak jejich funkci. Druhý efektorový enzym je fosfolipasa C. Jejím substrátem jsou fosfatidylinositolové fosfolipidy buněčné membrány, ze kterých odštěpuje inositoltrifosfát ( $IP_3$ ). Ten je podobně jako cAMP messengerem v cytosolu buňky (např. mechanismus regulace hladkého svalstva). Po odštěpení  $IP_3$  zůstává v membráně diacylglycerol. Ten aktivuje enzym proteinkinasu C, který má úlohu srovnatelnou s proteinkinase A.<sup>1,8</sup>

V současné době se předpokládá existence 5 typů mAChR ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$ ,  $M_5$ ). Funkce je doposud do značné míry objasněna pouze u  $M_1$ - $M_3$ .

$M_1$  receptory jsou lokalizovány na většině nervových buněk a ovlivňují jejich funkčnost resp. schopnost vést elektromagnetický potenciál. K tomu dochází cestou aktivace fosfolipasy C a tak ovlivněním některých napětím řízených iontových kanálů (např. proteinkinasa C-dependetní chloridové kanály)<sup>9</sup>

Aktivací  $M_2$  receptorů dochází k inhibici adenylátcyklasy a otevření draselných ( $K^+$ ) kanálů v myocytech a tím se zvětšuje možnost úniku  $K^+$  z buněk. Tím dojde ke

snížení srdeční frekvence, snížení síly stahu srdečního svalu a snižuje se i vodivost pro akční potenciál (tj. agonisté těchto receptorů působí negativně chronotropně, inotropně a negativně dromotropně).<sup>1,9</sup>

M<sub>3</sub> jsou nejhojněji zastoupeny na buňkách hladkých svalů. Obsazením těchto receptorů dojde k aktivaci fosfolipasy C. Tím se zvýší hladina IP<sub>3</sub> v cytosolu a ten mobilizuje Ca<sup>2+</sup> z endoplazmatického retikula. Tím dojde ke zvýšení tonu hladkého svalstva.<sup>1,8</sup>

Vasodilatační účinek acetylcholinu na některé cévy je pravděpodobně zprostředkováván M<sub>4</sub> receptory, které jsou spojené s inhibicí adenylátcyklasy. Pravděpodobně se jedná o presynaptický efekt některého neadrenergního necholinergního mediátoru (např. oxid dusnatý).<sup>10</sup>

M<sub>5</sub> receptory jsou lokalizovány v CNS a buněčné změny se dějí cestou aktivace fosfolipasy C.<sup>8</sup>

## 2.3 Cholinesterasy

### 2.3.1 Fyziologická funkce cholinesteras

Cholinesterasy jsou skupina enzymů, zastoupených v tělech obratlovců i bezobratlých živočichů. Patří do skupiny esteras. Jejich základní funkcí, je hydrolytické štěpení esterů cholinu z nichž nejpodstatnější je acetylcholin.<sup>11,12</sup>

### 2.3.2 Butyrylcholinesterasa

U savců rozeznáváme dva nejvýznamnější zástupce. Butyrylcholinesterasa (BuChE E.C. 3.1.1.8.) je syntetizována v játrech a je hojná v krevní plazmě. Funkce BuChE je méně specifická. Kromě fundamentální funkce, kterou je hydrolýza hydrofilních i hydrofobních esterů cholinu funguje i jako bioscavanger řady xenobiotik jako jsou organofosfátové nebo karbamátové inhibitory cholinesteras.<sup>13 14</sup>

### 2.3.3 Acetylcholinesterasa

#### 2.3.3.1 Fyziologická funkce acetylcholinesterasy

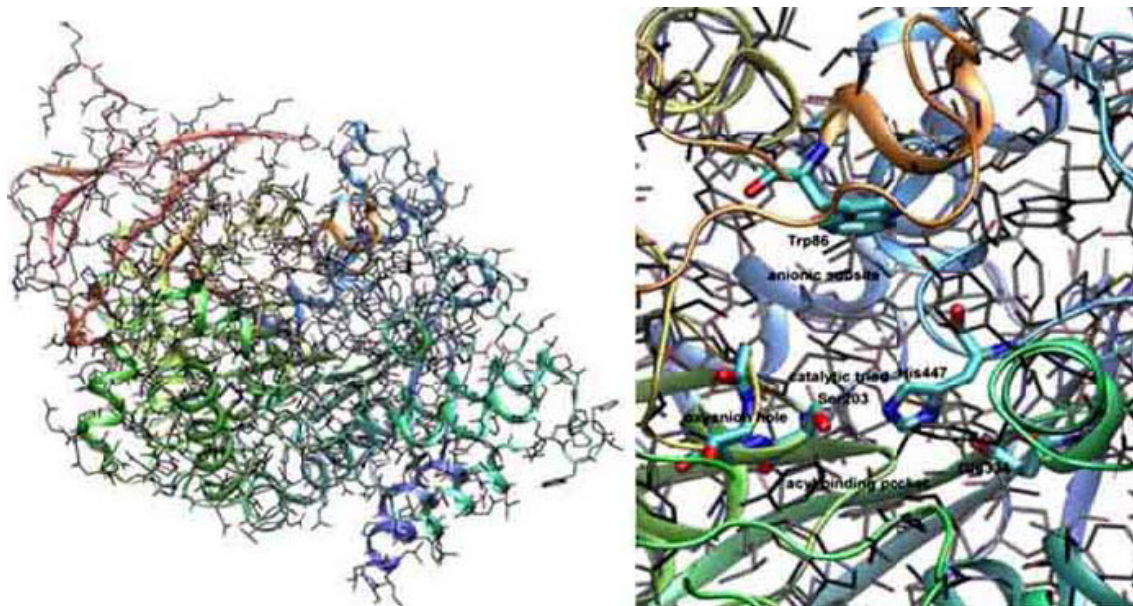
Acetylcholinesterasa (AChE E.C. 3.1.1.7) je lokalizována v synapsích nervů periferního i centrálního nervového systému. Je přítomna i v erytrocytech nebo na nervosvalové ploténce.<sup>15</sup> Fyziologickou funkcí AChE je rychlé rozštěpení acetylcholinu, krátce po jeho navázání na receptorový protein. Kontroluje tak cholinergní přenos signálu v synaptické štěrbině resp. správnou dobu jeho trvání. Toho je dosaženo tak, že acetylcholin je rozštěpen krátce po navázání na receptorový protein a tím je zabráněno hyperstimulaci cílové struktury. Proto má jakékoliv narušení správné funkce AChE vážné následky.<sup>16</sup>

### 2.3.3.2 Molekulární struktura acetylcholinesterasy

Enzym v neporušeném stavu je monomer, který má primární strukturu skládající se z 537 aminokyselin s Asp-1 na N-konci a Cys-537 na C-konci. Molekulová hmotnost je kolem 60 000 daltonů. Monomer enzymu obsahuje  $\alpha$  i  $\beta$  uspořádání.<sup>17</sup>

Jednotlivé molekuly podjednotek se mohou disulfidickými můstky spojovat do katalytických dimerů. Dimery se mohou hydrofobními interakcemi spojovat do tetramerů. Tyto tetramery mohou navázat hydrofobní podjednotku bez katalytické aktivity, která zatím nebyla přesně popsána. Byl popsán značný polymorphysmus těchto amfifilních struktur. Mají stejnou aktivitu, ale liší se hydrofilními vlastnostmi. Dimery se mohou zakotvit na buněčné membrány pomocí fosfatidylinositolu nebo polypeptidickým řetězcem.<sup>18</sup>

Aktivní místo AChE je představováno prohlubní hlubokou přibližně 20 Å (200 nm) hlubokou, která byla prostudována u různých živočišných druhů pomocí metody navázání ligandů a krystalograficky. Aktivní místo je možné rozdělit na dvě části: A-katalytickou, která obsahuje katalytickou triádu Ser-203, His-447, Glu-334; na druhé straně zde byla popsána P-periferní, anionická část na okraji aktivního místa obsahující zbytky aminokyselin Tyr-72, Tyr-124, Trp-286, Tyr-341 a Asp-74. Poslední výzkumy ukazují, že tato periferní část má větší význam pro funkci enzymu, než se dosud předpokládalo. Ligandy navázané k P-části mohou vzhledem k A-části působit jako sterické inhibitory nebo alosterické induktory. Například vysoká koncentrace substrátu v P-části může vést k nižší rychlosti hydrolýzy v A-části.<sup>19</sup>



**Obrázek 1.** Strukturní model acetylcholinesterasy a detail aktivního centra

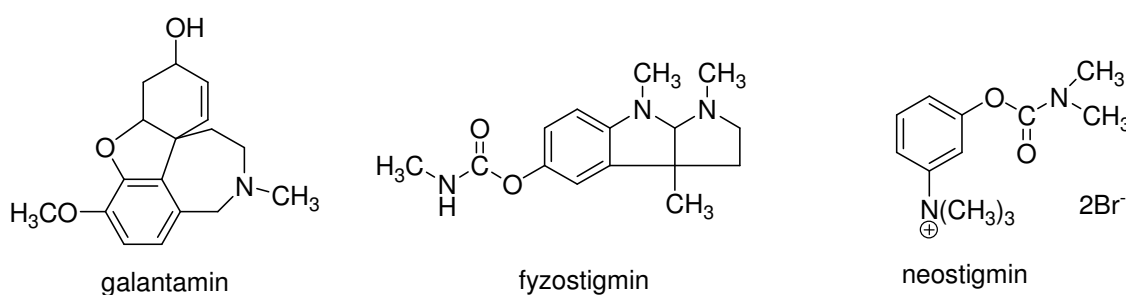


## 2.4 Inhibitory acetylcholinesterasy

Inhibitory AChE jsou sloučeniny, které mají potenciál zablokovat aktivní místo molekuly AChE a zabránit tak ve štěpení ACh. Dochází k hromadění neuromediátoru v prostoru synapse a hyperstimulaci cílové struktury. V některých případech to může být přínosem, např. při terapii Alzheimerovi, Parkinsonovi choroby nebo Myasthenia gravis. V druhém případě dojde k přílišné inhibici funkce AChE a tím dochází k celé řadě dějů, které mohou vyústit v zánik organismu.<sup>20</sup>

### 2.4.1 Reverzibilní inhibitory

Reverzibilní inhibitory jsou sloučeniny, které vytvářejí s AChE komplex s omezenou životností, inhibují ji pouze dočasně. Jedná se zejména o sloučeniny s kvarterním amoniovým dusíkem ve své molekule. Jako příklad lze uvést např. přírodní alkaloid fyzostigmin a syntetické sloučeniny neostigmin nebo pyridostigmin. Tyto sloučeniny mají povahu falešného substrátu, proto se váží na aktivní místo a esterifikují aktivní místo karbamovou kyselinou. Jejich použití je např. v terapii glaukomu, při otravách parasympatolytiky, při atonii střev nebo močového měchýře. Tyto látky se používají i jako profylaxe otrav ireverzibilními inhibitory AChE (galantamin). Galantamin patří do skupiny tzv. neacylujících inhibitorů.<sup>1,21</sup>



Obrázek 2. Příklady struktury reverzibilních inhibitorů AChE

### 2.4.2 Ireverzibilní inhibitory

Důležitými zástupci této skupiny jsou organofosforové (OF) sloučeniny. OF jsou deriváty kyselin fosfonové a fosforečné nebo jejich thio-analoga.<sup>22,23</sup> Látky obsahující

ve své molekule skupinu P=S nemají tak výrazný inhibiční potenciál a vyžadují desulfuraci na analogický oxo-derivát.<sup>22</sup> Tato konverze se označuje jako letální syntéza.<sup>24</sup>

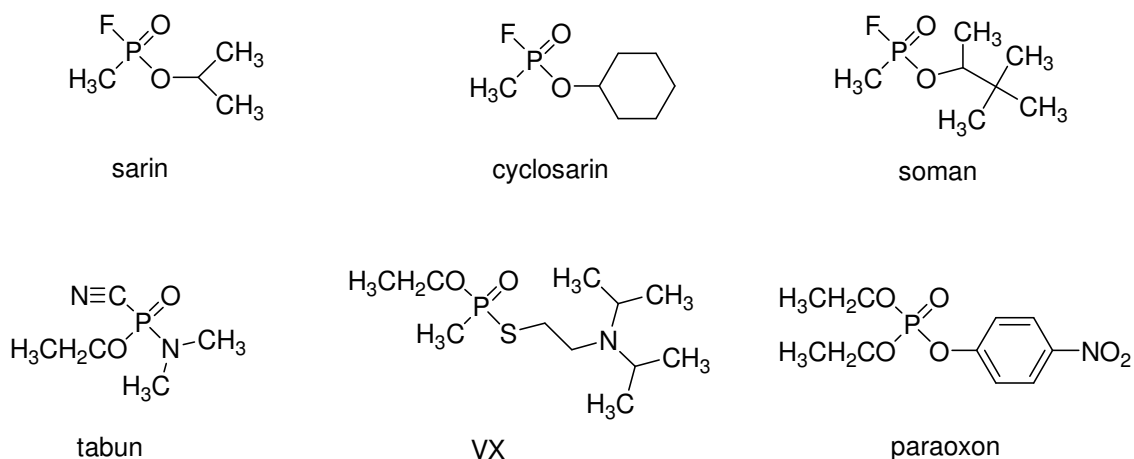
#### 2.4.2.1 Nervově paralytické látky

První z těchto sloučenin byly připraveny ve 30. letech minulého století v Německu. Byly to nervově paralytické látky (NPL) vyvinuté pro válečné účely (např. tabun, soman, sarin; Obr. 2). Nebyly použity během druhé světové války, ale iráckým režimem v průběhu 80. let 20. století a při teroristických útocích v Tokijském metru v roce 1995.<sup>25</sup>

OF jsou dnes rozšířené po celém světě. Látky jako sarin (GB; *O*-isopropylmethylfluorofosfonát) soman (GD; *O*-pinakolylmethylfluorofosfonát), cyclosarin (GF; *O*-cyclohexylmethylfluorofosfonát), tabun (GA; *O*-ethylamidocyanofosfát) a látka VX (*O*-ethyl-*S*-(2-diisopropylaminoethyl)-methylthiofosfonát) patří mezi nejnebezpečnější látky mezi OF. Fyzikálně-chemické vlastnosti těchto látek jsou si velmi podobné s výjimkou látky VX. Jsou bezbarvé těkavé kapaliny bez zápachu dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Látka VX je bezbarvá kapalina bez zápachu, pro kterou je charakteristická nízká těkavost.<sup>26</sup>

#### 2.4.2.2 Organofosfátové pesticidy a insekticidy

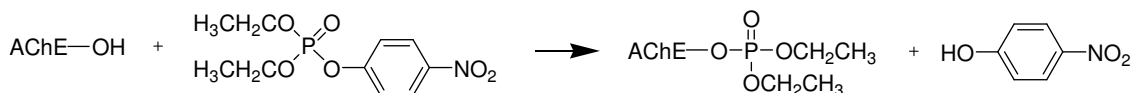
Mnoho OF se však používá v jiných oblastech lidské činnosti zejména jako insekticidy, změkčovadla nebo zpomalovače hoření. K častým otravám dochází v zemědělství při použití pesticidů jako jsou chlorpyrifos (*O,O*-dimethyl-*O*-(3,5,6-trichlor-2-pyridyl)-thiofosfát), parathion (*O,O*-diethyl-*O*-(4-nitrofenyl)-thiofosfát) a jeho oxo-derivát paraoxon. Tyto látky jsou nebezpečné zejména pro svoji snadnou přípravu a dostupnost.<sup>11,22</sup>



**Obrázek 3.** Příklady struktury organofosfátových sloučenin

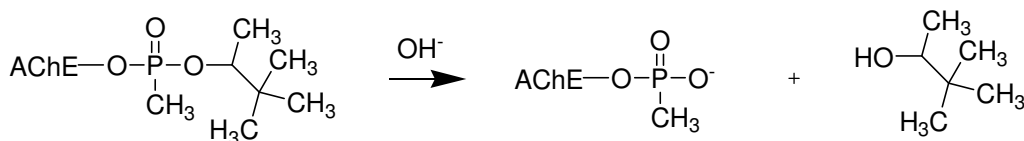
### 2.4.2.3 Mechanismus inhibice

OF inhibují AChE kovalentní fosfonylací resp. fosforylací volného hydroxyly Ser-203 v aktivním místě enzymu. (Schéma 1)<sup>27</sup> Vzniklý komplex enzymu s inhibítorem je velice stabilní a rozpadá se velmi pomalu. Inhibice je označována jako ireverzibilní přesto, že se o ireverzibilní inhibici v pravém smyslu nejedná.<sup>1</sup> Poslední výzkumy ukazují, že do interakce s inhibítorem je zapojena i P-strana aktivního místa enzymu, kde dochází ke konformačním změnám (Trp-86 a Tyr-133).<sup>19</sup>



**Schéma 1.** Mechanismus inhibice AChE paraoxonem

Dále dochází k procesu, který závisí na druhu OF a je označován jako „aging“ nebo-li stárnutí enzymu. Z molekuly inhibitoru se odštěpí část jeho molekuly (dealkylace, deaminace) a je nahrazena hydroxylovou skupinou (Schéma 2). Enzym se stává po procesu stárnutí nereaktivovatelným. Poločas stárnutí enzymu může být v řádu minut v případě somanu až po několik hodin v případě dalších NPL.<sup>25,27</sup>



**Schéma 2.** Aging AChE inhibované somanem

#### 2.4.2.4 Klinický obraz akutní otravy OF

Výše popsaným mechanismem dochází k inhibici AChE, která není schopna plnit svou funkci. Hromadí se ACh má za následek celou řadu příznaků. Ty jsou dány typem receptorů, které jsou hyperstimulovány, dobou expozice a dávkou OF. Podle zasažených částí nervového systému dělíme příznaky na nikotinové, muskarinové a centrální.

**Nikotinové účinky** jsou způsobeny nadměrnou stimulací nikotinových receptorů, které se vyskytují zejména na synapsích vegetativních ganglií a nervosvalových plotének. To se projevuje tachykardií způsobenou drážděním sympatiku, hypertenzí, svalovou slabostí a fascikulacemi, které mohou vyústit v tonicko-klonické křeče a paralýzu svalstva.<sup>22,26,28</sup>

**Muskarinové účinky** jsou charakterizovány např. miózou, poruchami akomodace čočky, nadměrnou sekrecí bronchiálních žláz, kontrakcí bronchiální svaloviny, salivací, slzením. Na srdci se nadměrná stimulace muskarinových receptorů projeví bradykardií a s tím spojeným poklesem krevního oběhu.<sup>25</sup>

**Centrální účinky** jsou charakterizovány útlumem dechového a kardiovaskulárního centra v prodloužené míše. S tím je spojeno nebezpečí dechové nedostatečnosti a smrti udušením. Nadměrným drážděním receptorů v centrálním nervovém systému dochází k bolestem hlavy, neklidu, zmatenosti, nevolnosti nebo závratím.<sup>22,26</sup>

K smrti po zasažení OF dochází nejčastěji kvůli akutní dechové insuficienci. Ta nastává jak z důvodů periferních (ochrnutí dýchacích svalů včetně bránice), tak z důvodů centrálních (inhibice dechového centra v prodloužené míše).<sup>22,26</sup>

Po 1-4 dnech po intoxikaci nastupuje proximálně postupující paralýza končetin. Tento proces je nezávislý na podání anticholinergik i reaktivátorů a je nutná asistovaná plicní ventilace. Stav pacienta bývá označován jako „intermediate syndrom“.<sup>22</sup>

#### 2.4.2.5 Pozdní neurologický efekt

Pozdní neurologický efekt (PNE) zřejmě není spojen s anticholinesterasovou aktivitou OF.<sup>22</sup> Některé OF, které mají velmi slabou afinitu k AChE, vykazují velkou tendenci vyvolávat tento syndrom. Jejich nejdůležitějším zástupcem je tri-O-

kresylfosfát. PNE nastupuje týdny až měsíce po intoxikaci OF a to i v případech, kdy dávka OF byla nižší, než aby se manifestovaly příznaky akutní intoxikace.<sup>26</sup>

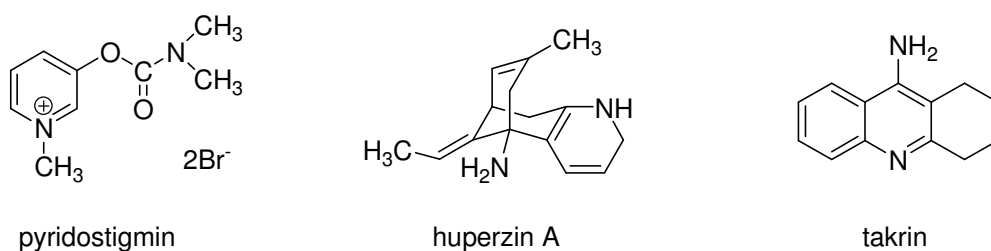
Na buněčné úrovni dochází k fosforylaci, dealkylaci a denuraci proteinů axonů a později k jejich demyelinizaci a ke kumulaci makrofágů. Charakteristická je inhibice a následná dealkylace AChE. Takové změny probíhají na periferních nervech i v CNS.<sup>22,26</sup>

Klinicky se PNE manifestuje zvýšenou spasticitou příčně pruhovaných svalů postupující proximálně od distálních částí končetin. Zvýšené cholinergní dráždění se projeví zvýšenou sekrecí bronchiální sliznice, spasmem bronchů, laryngitidou a faryngitidou.<sup>26</sup> Rekonvalescence je pomalá, PNE může trvat měsíce i roky.

## 2.5 Profylaxe otrav OF

Podávání látek sloužících k profylaxi otrav OF je běžná u osob u nichž se předpokládá, že by se mohli pohybovat v zamořeném prostředí např. vojáci. Jako profylaktika slouží reversibilní inhibitory AChE, nejčastěji pyridostigmin. Molekula pyridostigminu nese náboj na kvarterním dusíku a to ji limituje v prostupu hematoencefalickou bariérou. Pyridostigmin se v praxi užívá jako přípravek PANPAL, kde je kombinován s dvěma anticholinergními účinnými látkami benactyzinem a trihexyfenidylem. Bylo vyvinuto nové české transdermální profylaktické antidotum proti nervově paralytickým látkám, TRANSANT doplněný o reaktivátor HI-6, který doplňuje PANPAL. Účinek obou antidot v kombinaci převyšuje účinky dosud ve světě zavedených profylaktických antidot.

Podobné vlastnosti mají také huperzin nebo takrin, které jsou podbně jako galantamin neacylujícími inhibitory. Galantamin je nejen léčivá látka používaná k terapii Alzheimerovy choroby, ale také reverzibilní inhibitor AChE, který prostupuje hematoencefalickou bariérou. Profylaktika ochrání molekulu enzymu před navázání OF. Další skupinou použitelnou k profylaxi jsou cholinesterasy např. lidská BChE nebo fosfotiesterasa, které fungují jako bioscavengery. Limitujícími faktory jsou velikost molekuly a imunologické komplikace při podání enzymových přípravků.<sup>20,29,30</sup>



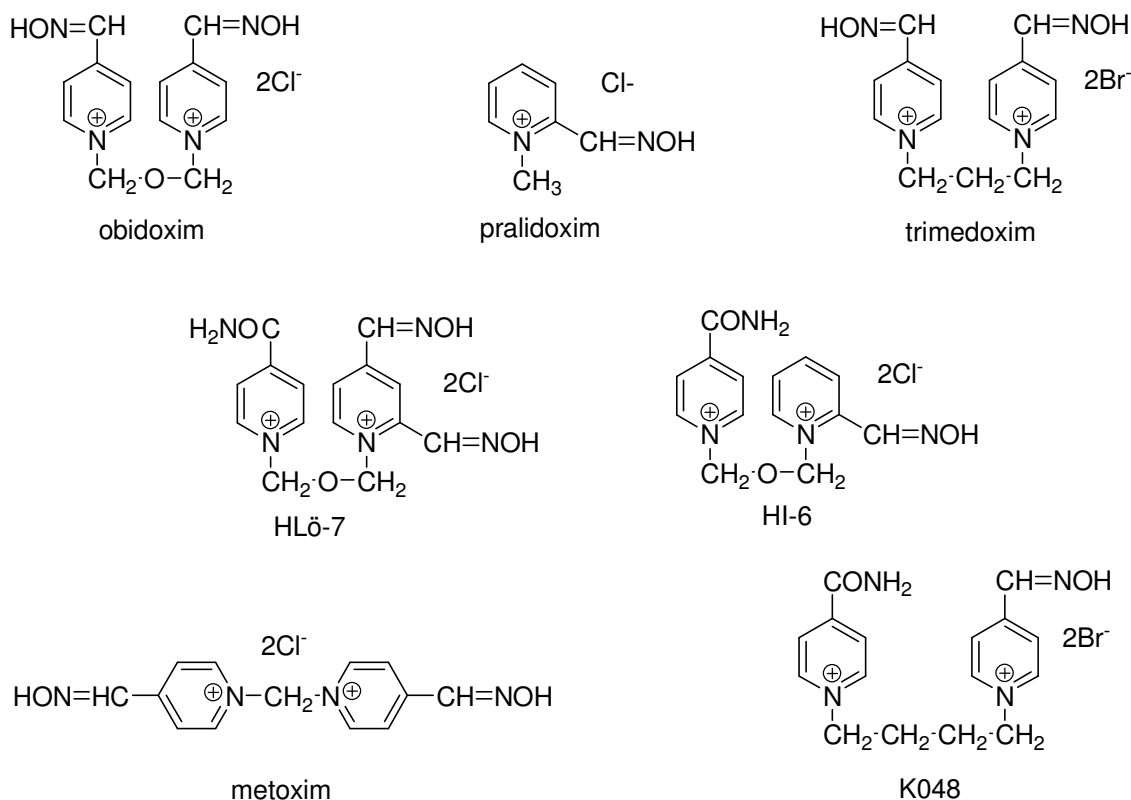
Obrázek 4. Příklady struktury látek používaných k profylaxi

## 2.6 Terapie otrav OF

Terapeuticky se při otravách OF používá kombinace reaktivátoru AChE se sloučeninou s anticholinergním působením (přednostně atropin) a diazepamem.

Diazepam je antikonvuzivní složkou terapie.

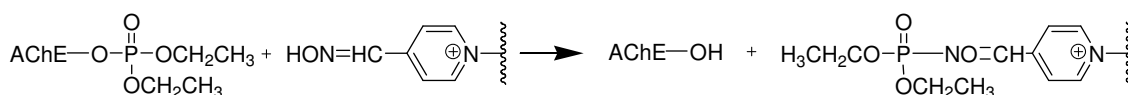
Atropin byl izolován z řady rostlin čeledi *Solanaceae*. Z chemického hlediska je to ester kyseliny tropové. V rostlinách se vyskytuje jako (+)-hyoscyamin, který v roztoku spontánně přesmykuje na (±)-hyoscyamin (atropin)<sup>1</sup>. Atropin je kompetitivní antagonist muskarinových receptorů a má také afinitu k nikotinovým receptorům. Blokádou těchto receptorů dochází k omezení jejich nadměrného dráždění nahromaděným ACh. Dávka atropinu je titrována do nejvyšší možné dávky dokud není dosaženo požadovaného účinku nebo dokud nedojde k výskytu nežádoucích účinků.<sup>22</sup>



Obrázek 5. Příklady struktury reaktivátorů AChE

## 2.6.1 Reaktivátory acetylcholinesterasy

Reaktivátory AChE jsou kvarterní pyridiniové soli (monokvarterní a biskvarterní), které mají ve své molekule nukleofilní skupinu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím oximové (hydroxyiminomethylové) skupiny (v disociované podobě oximátového aniontu) jako nukleofilu.<sup>20,29</sup> Oximátový iont nukleofilně štěpí vazbu mezi enzymem a inhibítorem a obnovuje tak fyziologickou funkci enzymu (Schéma 3).<sup>11</sup>



**Schéma 3.** Mechanismus reaktivace AChE aldoximovým reaktivátorem

Zatím nebyl nalezen dostatečně širokospektrý reaktivátor, který by byl schopen reaktivovat AChE inhibovanou všemi typy OF. Většina dnes používaných reaktivátorů AChE byla vyvinuta pro otravy NPL a OF pesticidům byla věnována malá nebo žádná pozornost.

V současnosti v praxi používané sloučeniny pralidoxim (2-PAM; 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium chlorid), obidoxim (Toxogonine<sup>®</sup>; 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropan dichlorid) a H-oxim HI-6 (1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxapropan dichlorid) jsou považovány za nejpodstatnější při terapii otrav OF. Další reaktivátory se v současné době již nepoužívají: methoxim (MMC-4; 1,1-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-methan dichlorid), trimedoxim (TMB-4; 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-propan dibromid). Další nové látky jsou v současné době v různých fázích vývoje: HLö-7 (1-(2,4-bis(hydroxyiminomethylpyridinium))-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxa-propan dichlorid), a K048 (1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-propan dibromid) (Obrázek 5).<sup>18,28</sup>



## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiál a metody

Bylo testováno několik sérií reaktivátorů. Jako inhibitor byl použit pesticid paraoxon.

#### 3.1.1 Princip testování

Pro potřeby testování byl použit biologický substrát s vysokým obsahem cílového enzymu (AChE). AChE byla ve vzorku inhibována zvoleným inhibitorem o přesně stanovené koncentraci (Rovnice 1). Takto inhibovaná AChE byla schopna štěpit přirozený substrát s aktivitou asi 5% aktivity intaktní AChE.

Po uplynutí zvoleného času pro inhibici byl ke směsi OF-AChE přidán reaktivátor a proběhla reaktivace (Rovnice 3). Díky tomuto zásahu je AChE opět schopna plnit svoji fyziologickou funkci, kterou je štěpení acetylcholinu.

Vznikající acetát je v roztoku titrován odměrným roztokem NaOH (Rovnice 4).

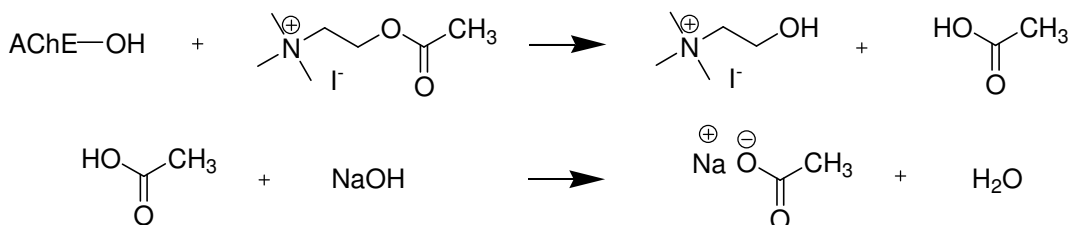


Schéma 4. Princip stanovení reaktivační účinnosti

#### 3.1.2 Chemikálie a přístroje

Použité chemikálie byly dodány od firem Fluka a Aldrich a použity bez dalšího přečištění. Komerčně dostupné i nové reaktivátory byly dříve připraveny na pracovišti Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové. Jejich čistota byla ověřena pomocí spektrálních metod (NMR, HPLC-MS). Zdrojem AChE byl 10% vodný homogenát (w/v) z mozku laboratorního potkana (Whistar). Pro měření reaktivace byl použit automatický titrátor RTS 822 (Radiometr, Kodaň, Dánsko).

### 3.1.3 Metoda měření

Prováděny byly tři typy potenciostatických *in vitro* měření - aktivita intaktního enzymu, aktivita inhibovaného enzymu a reaktivovaného enzymu. Měření se prováděla při teplotě 25°C a pH 7.6. U každého testovaného reaktivátoru bylo dvakrát provedeno měření při dvou koncentracích-  $10^{-3}$ M a  $10^{-5}$ M.

**Měření intaktní AChE:** Do měřicí nádoby bylo odměřeno destilované H<sub>2</sub>O (20 ml) a 3 M NaCl (2,5 ml). Byl přidán mozkový homogenát (0,5ml) a pH bylo upraveno na hodnotu 8,0. K takto vzniklému roztoku byl přidán 0,02 M acetylcholin jodid (2 ml) a vznikající acetát byl přístrojem titrován odměrným roztokem 0,1 M NaOH. Ze spotřeby NaOH byla vypočtena hodnota reaktivace.

**Měření inhibice:** Do zkumavky byl odměřen mozkový homogenát (0,5 ml) a isopropanolového roztoku paraoxonu (20μl). Tato směs byla inkubována po dobu 30 min. Po uplynutí tohoto času byla směs přenesena do měřicí nádoby s destilovanou H<sub>2</sub>O (18,5 ml) a 3 M NaCl (2,5 ml) a zkumavka byla vypláchnuta destilovanou H<sub>2</sub>O (1 ml). Aktivita enzymu byla změřena stejně jako v případě intaktní AChE. Je velice důležité, aby koncentrace paraoxonu byla zvolena tak aby aktivita po inhibici byla v rozmezí 5-10% aktivity intaktní AChE.

**Měření reaktivace:** Do zkumavky byl odměřen mozkový homogenát (0,5 ml) a isopropanolového roztoku paraoxonu (20μl). Po 30 min inkubace při 25°C byl do zkumavky přidán reaktivátor (0.2 ml) a objem byl doplněn pomocí destilované H<sub>2</sub>O (0.8 ml) na 2 ml. Tato směs byla inkubována 10 min. Po této době byla směs stejně jako v předchozím případě kvantitativně přenesena do měřicí nádoby, do které byla předtím předložena destilovaná H<sub>2</sub>O (17,5 ml) a 3 M NaCl (2,5 ml) a byla změřena aktivita reaktivované AChE.

Z naměřených aktivit byly po dosazení do následujícího vzorce vypočítány reaktivační účinnosti jednotlivých reaktivátorů a jejich směrodatné odchylky.

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

$x$  reaktivace [%]

$a_0$  aktivita intaktního enzymu

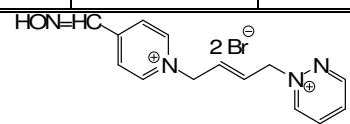
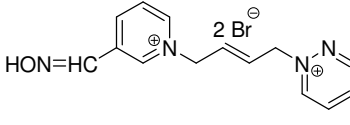
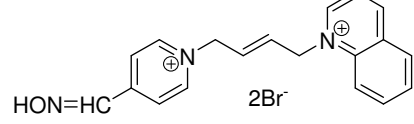
$a_r$  aktivita reaktivovaného enzymu

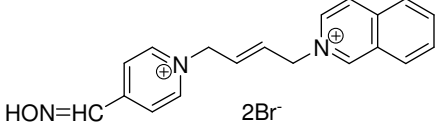
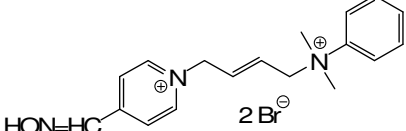
$a_i$  aktivita inhibovaného enzymu

## 3.2 Výsledky

Po dosažení naměřených aktivit do výše uvedeného vzorce bylo dosaženo následujících hodnot reaktivace (Tabulka 1).

Reaktivátor					Paraoxon (% reaktivace)	
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	A	X <sup>-</sup>	c (10 <sup>-3</sup> M)	c (10 <sup>-5</sup> M)
Pralidoxim	2-CH=NOH	-	CH <sub>3</sub>	I <sup>-</sup>	42 ± 1	0
Obidoxim	4-CH=NOH	4-CH=NOH	CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub>	2Cl <sup>-</sup>	76 ± 2	37 ± 2
HI-6	4-CONH <sub>2</sub>	2-CH=NOH	CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub>	2Cl <sup>-</sup>	35 ± 2	0
Metoxim	4-CH=NOH	4-CH=NOH	CH <sub>2</sub>	2Br <sup>-</sup>	71 ± 3	0
Trimedoxim	4-CH=NOH	4-CH=NOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2Br <sup>-</sup>	46 ± 1	50 ± 4
K027	4-CH=NOH	4-CONH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2Br <sup>-</sup>	59±4	21±1
K048	4-CH=NOH	4-CONH <sub>2</sub>	butylen	2Br <sup>-</sup>	57±4	5±2
K180	2-CH=NOH	3-CH=NOH	<i>p</i> -fenylen	2Br <sup>-</sup>	0	46 ± 1
K181	2-CH=NOH	4-CH=NOH	<i>p</i> -fenylen	2Br <sup>-</sup>	0	53 ± 6
K182	3-CH=NOH	4-CH=NOH	<i>p</i> -fenylen	2Br <sup>-</sup>	0	0
K183	2-CH=NOH	3-CH=NOH	<i>m</i> -fenylen	2Br <sup>-</sup>	0	49 ± 4
K184	2-CH=NOH	4-CH=NOH	<i>m</i> -fenylen	2Br <sup>-</sup>	0	53 ± 3
K185	3-CH=NOH	4-CH=NOH	<i>m</i> -fenylen	2Br <sup>-</sup>	0	0
K186	2-CH=NOH	3-CH=NOH	<i>o</i> -fenylen	2Br <sup>-</sup>	0	0
K187	2-CH=NOH	4-CH=NOH	<i>o</i> -fenylen	2Br <sup>-</sup>	0	0
K188	3-CH=NOH	4-CH=NOH	<i>o</i> -fenylen	2Br <sup>-</sup>	0	0
K005	2-CH=NOH	2-CH=NOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2Br <sup>-</sup>	16±2	0
K018	4-CH=NOH	4-CH=NOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2Br <sup>-</sup>	46±1	50±4
K099	3-CH=NOH	3-CH=NOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2Br <sup>-</sup>	9±0	0
K207	2-CH=NOH	3-CH=NOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2Br <sup>-</sup>	33±1	12±0
K208	2-CH=NOH	4-CH=NOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2Br <sup>-</sup>	25±0	38±0
K209	3-CH=NOH	4-CH=NOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2Br <sup>-</sup>	41±1	43±2
K189	3-CH=NOH	4-CN	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2Br <sup>-</sup>	4±0	25±0
K190	2-CH=NOH	4-CN	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2Br <sup>-</sup>	0	0
K011	4-CH=NOH	4-CN	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2Br <sup>-</sup>	32±3	3±1
K201	2-CH=NOH	4-CONH <sub>2</sub>	( <i>E</i> )-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	44±1	39±3
K202	3-CH=NOH	4-CONH <sub>2</sub>	( <i>E</i> )-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	16±0	0
K203	4-CH=NOH	4-CONH <sub>2</sub>	( <i>E</i> )-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	64±3	23±1

K204	2-CH=NOH	3-CONH <sub>2</sub>	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	18±1	33±4
K205	3-CH=NOH	3-CONH <sub>2</sub>	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	0	25±0
K206	4-CH=NOH	3-CONH <sub>2</sub>	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	54±0	49±0
K280	2-CH=NOH	2-CH=NOH	(Z)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	26±1	13±0
K281	3-CH=NOH	3-CH=NOH	(Z)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	5±1	8±1
K282	4-CH=NOH	4-CH=NOH	(Z)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	40±6	46±1
K283	2-CH=NOH	2-CH=NOH	(Z)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	0	14±0
K284	2-CH=NOH	4-CH=NOH	(Z)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	19±2	29±1
K285	3-CH=NOH	4-CH=NOH	(Z)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	3±0	18±1
K250	4-CH=NOH	4-COOH	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	63±1	15±5
K251	4-CH=NOH	4-COOCH <sub>3</sub>	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	68±2	36±2
K252	4-CH=NOH	4-COOEt	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	68±2	30±2
K253	4-CH=NOH	4-fenyl	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	13±0	22±0
K254	4-CH=NOH	4-benzyl	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	0	14±1
K255	4-CH=NOH	-	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	57±0	22±2
K256	4-CH=NOH	4-CN	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	28±2	20±0
K258	4-CH=NOH	4-CH <sub>2</sub> OH	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	50±0	42±0
K260	4-CH=NOH	4-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> H	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	67±2	6±4
K261	4-CH=NOH	4-SCH <sub>2</sub> COOH	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	13±1	6±0
K262	4-CH=NOH	4-CH <sub>3</sub>	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	61±1	26±2
K263	4-CH=NOH	4-tercbutyl	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	52±1	14±1
K264	4-CH=NOH	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	0	8±1
K269	4-CH=NOH	4-(NH <sub>2</sub> )NOH	(E)-but-2-enylen		52±2	32±1
1-KM-2.1	3-CH=NOH	-	-CH <sub>3</sub>	I <sup>-</sup>	12±3	11±0
1-KM-3.1	4-CH=NOH	-	-CH <sub>3</sub>	I <sup>-</sup>	40±0	0
K033	2-CH=NOH	2-CH=NOH	butylen	2Br <sup>-</sup>	32±3	33±2
K075	4-CH=NOH	4-CH=NOH	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	60±1	46±2
K068	2-CH=NOH	2-CH=NOH	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	0	8±2
K069	2-CH=NOH	3-CH=NOH	(E)-but-2-enylen	2Br <sup>-</sup>	28±2	34±
K161				2 Br <sup>-</sup>	35±6	23±0
K162				2 Br <sup>-</sup>	34±0	0
K265				2 Br <sup>-</sup>	0	15±1

K266			43±0	48±4
K270			14±1	30±1

**Tabulka1.** Hodnoty reaktivace měřených sloučenin.

### 3.3 Diskuse

V současné době existuje jen omezené množství informací o vztahu struktury a účinnosti reaktivátorů AChE. Někteří autoři používají počítačové výpočty k definování nejvhodnější struktury pro tyto sloučeniny.<sup>31</sup> Cílem této práce je sledovat závislost reaktivační účinnosti ve vztahu ke struktuře nově připravených sloučenin proti paraoxonem inhibované AChE. Reaktivace OFI inhibované AChE je do značné míry specifický děj, který klade na strukturu reaktivátoru jisté nároky, které jsou diskutovány níže.

Aby reaktivátor splňoval požadavky pro použití *in vivo*, musí jeho reaktivační účinnost *in vitro* být nejméně 10%.<sup>32</sup> Navzdory tomu se ukázalo, že některé látky, které *in vitro* vykazovaly slabou reaktivační účinnost byly *in vivo* s úspěchem použitelné a naopak.<sup>33</sup> Použitelnost *in vivo* je limitována nejvyšší dosažitelnou koncentrací reaktivátoru  $10^{-4}$ M.<sup>34</sup> Proto má aktivita naměřená při koncentraci reaktivátoru  $10^{-5}$ M větší vypovídací hodnotu o možnostech dalšího výzkumu. Některé sloučeniny inhibují i reaktivují AChE současně. Tento fenomén byl poprvé popsán u reaktivátorů s xylenovým spojovacím řetězcem.<sup>35</sup> Nejpoužívanější sloučeniny pralidoxim a HI-6 jsou při koncentraci  $10^{-5}$ M v případě paraoxonem inhibované AChE neúčinné. V tomto případě se jako velmi nadějná ukazuje sloučenina K075, která je v současné době testovaná proti tabunem inhibované AChE. Její výsledky při koncentraci  $10^{-5}$ M proti paraoxonem inhibované AChE předčí všechny dosud používané sloučeniny.<sup>36</sup> Některé nově otestované sloučeniny však dosahují lepších výsledků i než K075. Obecně je známo, že pesticidy jsou slabšími inhibitory AChE než NPL. Důvodem je pomalejší průběh stárnutí inhibovaného enzymu.<sup>17</sup>

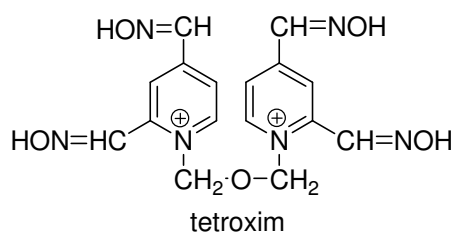
Na základě získaných výsledků mohla být provedena studie vztahu mezi strukturou a účinností sloučenin s potenciálem reaktivovat paraoxonem inhibovanou AChE. Sledována byla účinnost v závislosti těchto strukturálních značek - přítomnost oximové skupiny, počet oximových skupin, poloha oximové skupiny na heteroaromatickém jádře, přítomnost kvarterního dusíku, počet heteroaromatických jader, délka spojovacího řetězce a rigidita spojovacího řetězce a přítomnost jiných strukturálních znaků.

### 3.3.1 Přítomnost oximové skupiny

Přítomnost aldoximové (hydroxyiminomethylové) skupiny je u reaktivátorů AChE esenciální. Oximová skupina *in vivo* disociuje na oximátový anion, který následně nukleofilně atakuje kovalentní vazbu mezi enzymem a OFI. Látky bez tohoto strukturního motivu jsou velmi málo účinné nebo neúčinné.<sup>37</sup> Dříve používané odlišné funkční skupiny jako např. hydroxamové kyseliny, hydroxyiminoaceton nebo ketoximy nedosahují účinnosti aldoximů.<sup>28,38</sup>

### 3.3.2 Počet oximových skupin

Druhým strukturním znakem diskutovaným v této práci je počet oximových skupin ve struktuře reaktivátoru. Z dosažených výsledků je patrné, že přítomnost jedné oximové skupiny (té s nejnižším  $pK_a$ ) je zcela nezbytná, ale další zvyšování jejich počtu nevede k dramatickému zvýšení reaktivační účinnosti. Naopak u bisoximových sloučenin nevede nahrazení jedné oximové skupiny k významnému poklesu účinnosti (patrné je to např. na srovnání sloučenin **K284** a **K201** nebo **K075** proti **K251** a **K252**). Tato fakta je možné dávat do souvislosti se zvětšováním molekuly a následným horším přístupem do kavity enzymu např. tetroxim (Obrázek 6.). Neoximová substituce může vést k jiným druhům interakcí reaktivátoru s aktivním místem enzymu<sup>28</sup>



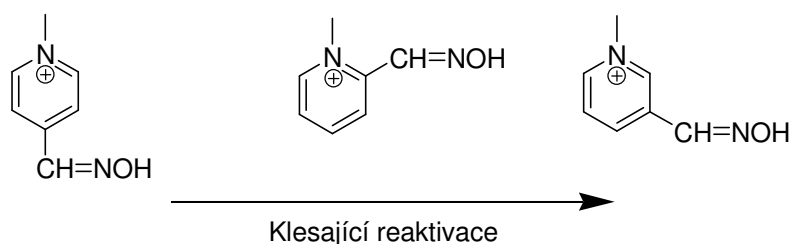
**Obrázek 6.** Tetroxim jako příklad látky s velkým počtem oximových skupin s nízkou reaktivační účinností



### 3.3.3 Poloha oximové skupiny

Nejvýhodnějšími umístění aldoximové funkční skupiny na pyridiniovém cyklu jsou polohy 2 a 4. Naše výsledky také ukazují, že lepších výsledků reaktivace paraoxonu dosahují monooximové reaktivátory s oximovou skupinou v poloze 4. Nicméně rozdíly mezi polohou 2 a 4 nejsou značné. (Obrázek 7.)<sup>20</sup> Reaktivátory s oximovou skupinou v poloze 3 vykazují zřetelně nižší reaktivaci účinnost (**K201** a **K203** ve srovnání s **K203**). To je zřejmě důsledek rozdílného  $pK_a$  oximů v polohách 2 a 4 ve srovnání s polohou 3.<sup>39</sup>

Navzdory tomu je zřejmé, že tato závislost je závislá na použitém inhibitoru. Pesticidy inhibovaná AChE je nejlépe reaktivovatelná oximy v poloze 4 (Tabulka 2). Naproti tomu AChE inhibovaná některými nervově paralytickými látkami např. cyklosarinem je nejnáze reaktivovatelná sloučeninami s oximem v poloze 2.<sup>28,40</sup>



Obrázek 7. Rozdíl v účinnosti v závislosti na poloze oximu

Reaktivátor	Poloha oximů		Paraoxon	Paraoxon
			Reaktivace $10^{-3}M$	Reaktivace $10^{-5}M$
K280	2-CH=NOH	2-CH=NOH	26±1	13±0
K281	3-CH=NOH	3-CH=NOH	5±1	8±1
K282	4-CH=NOH	4-CH=NOH	40±6	46±1
K283	2-CH=NOH	2-CH=NOH	0	14±0
K284	2-CH=NOH	4-CH=NOH	19±2	29±1
K285	3-CH=NOH	4-CH=NOH	3±0	18±1
K075	4-CH=NOH	4-CH=NOH	60±1	46±2

Tabulka 2. Reaktivaci účinnost v závislosti na poloze oximových skupin

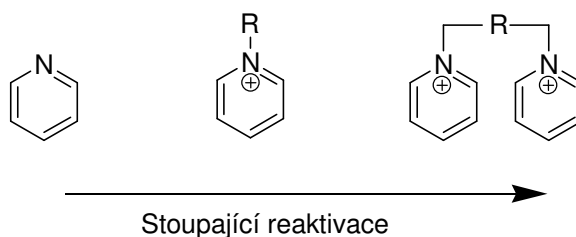
### 3.3.4 Přítomnost kvarterního dusíku

Je známo, že kvarterní dusík acetylcholinu se váže na vazebnou část aktivního centra molekuly AChE. Podobným mechanismem probíhá tento děj u molekuly reaktivátoru. Kvarterní dusík umožňuje vstup molekuly reaktivátoru do aktivního místa enzymu.<sup>41</sup> Kvarterní dusík je většinou součástí pyridiniového cyklu, ale existují i výjimky (**K270**). Díky přítomnosti kladně nabitého dusíku mají molekuly reaktivátoru významně zvýšenou afinitu k inhibované i intaktní AChE.<sup>28</sup>

### 3.3.5 Počet kvarterních dusíků

Použité sloučeniny mají jedno (pralidoxim) nebo dvě (většina sloučenin, které jsou v této práci studovány) heteroaromatická jádra ve své struktuře. Z výsledků je patrné, že perspektivnější jsou dosažené hodnoty reaktivity u sloučenin biskvarterních před monokvarterními a sloučeninami bez kvarterního dusíku. (Obrázek 8).<sup>42</sup>

U nabitých sloučenin však existuje problém s jejich penetrací přes hemato-encefalickou bariéru. *In vivo* experimenty bylo dokázáno, že k reaktivaci v CNS po zasažení OF inhibitory dochází. Přes hematoencefalickou bariéru penetrují látky monokvarterní (max. 10 %) i biskvarterní (max. 3 %) v závislosti na své struktuře.<sup>43,44,45</sup>



**Obrázek 8.** Závislost reaktivační účinnosti v závislosti na počtu kvarterních dusíků ve struktuře

### 3.3.6 Délka spojovacího řetězce

Délka spojovacího řetězce u biskvarterních látek je dalším strukturním prvkem diskutovaným v této práci. V případě *n*-methylenového řetězce má křivka vztahu mezi počtem methylenových jednotek typický zvonovitý tvar s maximem v oblasti 3-4 methylenových jednotek (Tabulka 3.).<sup>18</sup> Těmto látkám byla v této práci věnována největší pozornost.

Výše zmíněné pravidlo je však aplikovatelné pouze u sloučenin s nenasyceným uhlíkatým řetězcem. Sloučeniny s heteroatomem jako součástí spojovacího řetězce se z toto pravidlo nespňňují. Je to zřejmě důsledek přítomnosti volných elektronových párů ve struktuře. Za výjimku lze považovat i metoxim, který sice při koncentraci použitelné *in vivo* nemá uspokojivé výsledky, ale je to neúčinnější reaktivátor v případě cyklosarinem inhibované AChE.<sup>42</sup>

Reaktivátor	Spojovací řetězec	Paraoxon Reaktivace 10 <sup>-3</sup> M	Paraoxon Reaktivace 10 <sup>-5</sup> M
metoxim	CH <sub>2</sub>	71 ± 3	0
obidoxim	CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub>	76 ± 2	37 ± 2
trimedoxim	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	46 ± 1	50 ± 4
K027	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	59±4	21±1
K048	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	57±4	5±2

Tabulka 3. Vztah mezi strukturou spojovacího řetězce a reaktivační účinnosti

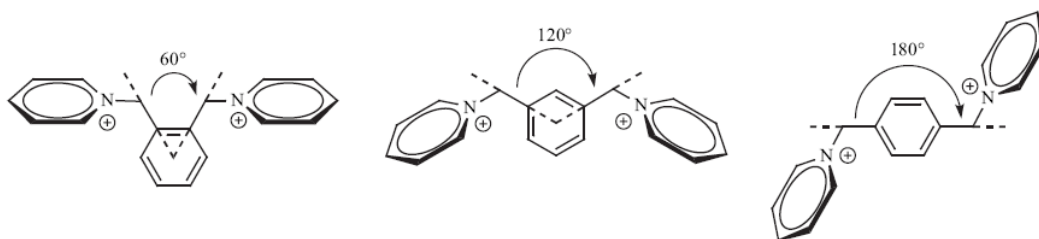
### 3.3.7 Přítomnost π elektronů ve struktuře spojovacího řetězce

Důležitým faktorem ovlivňujícím potenciál reaktivovat inhibovanou AChE je rigidita spojovacího řetězce. Zavedením dvojné vazby nebo aromatického cyklu do struktury spojovacího řetězce dojde k omezení volné otáčivosti vazeb. Volné π elektrony mohou interagovat s aromatickými zbytky aminokyselin v aktivním místě.

Výsledky ukazují, že zavedení but-2-enového spojovacího můstku má za následek zvýšení reaktivační účinnosti při koncentraci 10<sup>-5</sup>M. (**K048** v kontrastu ke **K075**) To je výhodné pro další výzkum těchto látek, protože právě tato koncentrace

reaktivátoru je vhodná pro *in vivo* experimenty. Mezi sloučeninami lišící se konfigurací na dvojné vazbě není patrný statisticky významný rozdíl.<sup>36</sup>

V případě xylenových spojovacích řetězců bylo dosaženo odlišných výsledků. Zdá se, že existuje souvislost mezi mírou rigidity spojovacích řetězců a inhibičním charakterem biskvarterních reaktivátorů. Tyto rigidní (xylenové) struktury při koncentraci  $10^{-3}\text{M}$  vykazovaly míru inhibice vyšší než bylo použití samotného inhibitoru. Reaktivace bylo dosaženo až při nižší koncentraci ( $10^{-5}\text{M}$ ). Jak již bylo uvedeno výše, tento fenomén u sloučenin s xylenovým spojovacím řetězcem byl již v minulosti popsán.<sup>35</sup> U sloučenin s xylenovými spojovacími řetězci je možné sledovat vztah mezi úhly, které svírají volně otáčivé vazby. Lepších výsledků bylo dosaženo u sloučenin, které obsahují ve struktuře vazby svírající větší úhly (**K180** a **K181**, **K183** a **K184**) (Obrázek 9.)<sup>28</sup>



**Obrázek 9.** Úhly mezi vazbami xylenových spojovacích řetězců

### 3.3.8 Přítomnost jiných strukturních motivů

V některých případech byla jedna z oximových skupin nahrazena jiným substituentem nebo byly provedeny i větší zásahy do struktury reaktivátoru.

U sloučenin s propanovým spojovacím řetězcem **K011**, **K189** a **K190** byla jedna z oximových skupin nahrazena karboxynitrilovou skupinou (-CN). Projevilo se to poklesem účinnosti ve srovnání s analogickými bisoximovými reaktivátory. Naproti tomu substituce oximu karbamoylem (-CONH<sub>2</sub>) se na účinnosti neprojevila statisticky významně (**K069** a **K075** ve srovnání s **K203** a **K204**).

Sloučeniny, u nichž byl jeden z pyridinových cyklů nahrazen jinou heteroaromatickou skupinou, bylo nejlepších výsledků dosaženo s reaktivátorem **K266**, u kterého byl pyridin substituován isochinolinem. Ve srovnání s **K265** (mající ve své struktuře chinolin) bylo dosaženo lepších hodnot reaktivace především při koncentraci  $10^{-5}\text{M}$ , použitelné pro *in vivo* experimenty.

U sloučenin s hydrofobní substitucí heteroaromatického cyklu předčily sloučeniny **K253**, **K255** a **K262** (substituenty v poloze 4 jsou fenyl, H a methyl) při koncentraci  $10^{-5}$ M sloučeniny **K254** (benzyl) a **K263** (*terc.*butyl)

Ve skupině sloučenin s hydrofilními substituenty v poloze 4 předčily sloučeniny **K251**, **K252** a **K258** ostatní reaktivátory v této skupině.

Dosud se však nepodařilo plně objasnit, jestli má přítomnost lipofilního resp. hydrofilního substituentu větší vliv na účinnost reaktivátorů AChE.

## 4 Závěr

Bylo otestováno více než 50 nových monokvarterních a biskvarterních reaktivátorů při koncentracích  $10^{-3}\text{M}$  a  $10^{-5}\text{M}$  proti paraoxonem inhibované AChE. Koncentrace  $10^{-5}\text{M}$  je použitelná pro *in vivo* experimenty.

Více než 30 těchto reaktivátorů dosáhlo takových hodnot reaktivace při koncentraci  $10^{-5}\text{M}$ , že mohou být postoupeny pro další experimenty. Některé sloučeniny dosáhly lepších výsledků než jakékoliv v současné době používané reaktivátory.

## 5 Přílohy



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Bioorganic &  
Medicinal  
Chemistry  
Letters

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16 (2006) 5673–5676

### Synthesis of asymmetrical bispyridinium compounds bearing cyano-moiety and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase

Kamil Musilek,<sup>a</sup> Ondrej Holas,<sup>a</sup> Kamil Kuca,<sup>b,c,\*</sup> Daniel Jun,<sup>b,c</sup>  
Vlastimil Dohnal<sup>d</sup> and Martin Dolezal<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>b</sup>Center of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>c</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>d</sup>Department of Food Technology, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

Received 27 June 2006; revised 31 July 2006; accepted 1 August 2006

Available online 24 August 2006

**Abstract**—Three asymmetrical AChE reactivators with cyano-moiety and propane linker were synthesized using modification of currently known synthetic pathways. Their potency to reactivate AChE inhibited by nerve agent tabun and insecticide paraoxon was tested in vitro and compared to pralidoxime, HI-6, obidoxime, K027, and K048. According to the results, three compounds seem to be promising against paraoxon-inhibited AChE. Better results were obtained for bisquaternary substances at least with one oxime group in position four. None of tested substances was able to satisfactorily reactivate tabun-inhibited AChE at concentration applicable for in vivo experiments.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

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

Kamil Musilek<sup>a,b</sup>, Ondrej Holas<sup>b</sup>, Jan Hambalek<sup>b</sup>, Kamil Kuca<sup>\*,a,c</sup>, Daniel Jun<sup>a,c</sup>, Vlastimil Dohnal<sup>d</sup> and Martin Dolezal<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>b</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>c</sup>Center of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>d</sup>Department of Food Technology, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

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

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

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





## Novel series of bispyridinium compounds bearing a (Z)-but-2-ene linker—Synthesis and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase

Kamil Musilek,<sup>a,b</sup> Ondrej Holas,<sup>a</sup> Kamil Kuca,<sup>b,c,\*</sup> Daniel Jun,<sup>b,c</sup> Vlastimil Dohnal,<sup>d</sup>  
Veronika Opletalova<sup>a</sup> and Martin Dolezal<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>b</sup>Center of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>c</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>d</sup>Department of Food Technology, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

Received 19 February 2007; revised 7 March 2007; accepted 9 March 2007

Available online 13 March 2007

**Abstract**—Six novel AChE reactivators with a (Z)-but-2-ene linker were synthesized using the known synthetic pathways. Their ability to reactivate AChE, which had been previously inhibited by nerve agent tabun or pesticide paraoxon, was tested in vitro and compared to pralidoxime, HI-6, obidoxime, and K075. The novel synthesized compounds were found to be ineffective against GA-inhibited AChE but the ability of (Z)-1,4-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide to reactivate paraoxon-inhibited AChE was comparable with that of oxime K075. Notably, the oxime group in position four substantially increased the ability of the novel compounds to reactivate paraoxon-inhibited AChE.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Monooxime reactivators of acetylcholinesterase with (*E*)-but-2-ene linker—Preparation and reactivation of tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase

Kamil Musilek,<sup>a,b</sup> Ondrej Holas,<sup>a</sup> Daniel Jun,<sup>b,c</sup> Vlastimil Dohnal,<sup>d</sup> Frank Gunn-Moore,<sup>e</sup>  
Veronika Opletalova,<sup>a</sup> Martin Dolezal<sup>a</sup> and Kamil Kuca<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>b</sup>Center of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>c</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>d</sup>Department of Food Technology, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

<sup>e</sup>School of Biology, University of St. Andrews, Bute Building, St. Andrews, KY16 9TS Fife, UK

Received 21 June 2007; revised 27 July 2007; accepted 3 August 2007

Available online 10 August 2007

**Abstract**—Acetylcholinesterase reactivators are crucial antidotes for the treatment of organophosphate intoxication. Fifteen new monooxime reactivators of acetylcholinesterase with a (*E*)-but-2-ene linker were developed in an effort to extend the properties of K-oxime (*E*)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide (K203). The known reactivators (pralidoxime, HI-6, obidoxime, K075, K203) and the new compounds were tested *in vitro* on a model of tabun- and paraoxon-inhibited AChE. Monooxime reactivators were not able to exceed the best known compounds for tabun poisoning, but some of them did show reactivation comparable with known compounds for paraoxon poisoning. However, extensive differences were found by a SAR study for various substitutions on the non-oxime part of the reactivator molecule.  
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Synthesis of monooxime-monocarbamoyl bispyridinium compounds bearing (*E*)-but-2-ene linker and evaluation of their reactivation activity against tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase

KAMIL MUSILEK<sup>1,2</sup>, ONDREJ HOLAS<sup>2</sup>, KAMIL KUCA<sup>1,3</sup>, DANIEL JUN<sup>1,3</sup>, VLASTIMIL DOHNAL<sup>4</sup>, VERONIKA OPLETALOVA<sup>2</sup>, & MARTIN DOLEZAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01, Hradec Kralove, Czech Republic, <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic, <sup>3</sup>Center of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic, and <sup>4</sup>Department of Food Technology, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

(Received 22 December 2006; in final form 15 February 2007)

### Abstract

Six AChE monooxime-monocarbamoyl reactivators with an (*E*)-but-2-ene linker were synthesized using modification of currently known synthetic pathways. Their potency to reactivate AChE inhibited by the nerve agent tabun and insecticide paraoxon was tested *in vitro*. The reactivation efficacies of pralidoxime, HI-6, obidoxime, K048, K075 and the newly prepared reactivators were compared. According to the results obtained, one reactivator seems to be promising against tabun-inhibited AChE and two reactivators against paraoxon-inhibited AChE. The best results were obtained for bisquaternary substances with at least one oxime group in position four.

**Keywords:** acetylcholinesterase, reactivation, nerve agent, tabun, pesticide, paraoxon, reactivator, oxime, inhibition

## 6 Literatura

- <sup>1</sup> Lüllman, H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie*. Grada Publishing: Praha, **2004**; s. 728.
- <sup>2</sup> Rand, JB. Acetylcholine. *WormBook*. **2007**, 1, 1-21.
- <sup>3</sup> Liu, X.; Xu, Y.; Li, H.; Wang, X.; Jiang, H.; Barrantes, FJ. Mechanics of channel gating of the nicotinic acetylcholine receptor. *PLoS Comput Biol*. **2008**, 1, 1-19.
- <sup>4</sup> McKay, BE.; Placzek, AN.; Dani, JA. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol*. **2007**, 74, 1120-1133.
- <sup>5</sup> Unwin, N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*. **1995**, 373, 37-43.
- <sup>6</sup> Cooper, E.; Couturier, S.; Ballivet M. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* **1991**, 350, 235-238.
- <sup>7</sup> Seguela, P.; Wadiche, J.; Dineley-Miller, K.; Dani J.A.; Patrick, J.W. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci* **1993**, 13, 596-604.
- <sup>8</sup> Kim, D.R.; Rah, S.H.; Sohn, J.H.; Yeh, B.I.; Ko, C.M.; Park, J.S.; Kim, M.J.; Lee, J.W.; Kong, I.D. Calcium mobilization by activation of M(3)/M(5) muscarinic receptors in the human retinoblastoma. *J. Pharmacol. Sci.* **2007**, 105, 184-192.
- <sup>9</sup> Malcolm P.; Caulfield; Nigel, J.M.; Birdsall - Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacological reviews*. **1998**, 50, 279-290.
- <sup>10</sup> Hashimoto, Y.; Morisawa, K.; Saito, H.; Jojima, E.; Yoshida, N.; Haga, T. Muscarinic M4 receptor recycling requires a motif in the third intracellular loop. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008** in press.
- <sup>11</sup> Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Dolezal, M. Novel series of bispyridinium compounds bearing a (Z)-but-2-ene linker--synthesis and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 3172-3176.
- <sup>12</sup> Bajgar, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.* **2004**, 38, 151-216.

- <sup>13</sup> Devkota, K.P.; Lenta, B.N.; Choudhary, M.I.; Naz, Q.; Fekam, F.B.; Rosenthal, P.J.; Sewald, N. Cholinesterase inhibiting and antiplasmodial steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2007**, *55*, 1397-1401.
- <sup>14</sup> Giacobini, E. *Butyrylcholinesterase – Its Function and Inhibitors*, Martin Dunitz, Taylor Francis Groupplc, United Kingdom, **2003**, s. 1-226.
- <sup>15</sup> Kuča, K.; Cabal, J.; Jun, D.; Kassa, J.; Bartošová, L.; Kunešová, G.; Dohnal, V. Strategy for the development of new acetylcholinesterase reactivators - antidotes used for treatment of nerve agent poisonings. *Biomed. Pa.p Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc Czech. Repub.* **2005**, *149*, 429-431.
- <sup>16</sup> Giacobini, E. *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*; Martin Dunitz: London, **2000**, 1–226.
- <sup>17</sup> Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal.; V, Dolezal, M. Synthesis of asymmetrical bispyridinium compounds bearing cyano-moiety and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *21*, 5673-5676.
- <sup>18</sup> Kuča, K.; Jun, D.; Musilek K.; Bajgar, J. Reactivators of tabun-inhibited acetylcholinesterase: Structure-biological activity relationship. *Frontiers in Drug Design & Discovery.* **2007**, *3*, 381-394.
- <sup>19</sup> Kaushik, R.; Rosenfeld, CA.; Sultatos, L.G. Concentration-dependent interactions of the organophosphates chlorpyrifos oxon and methyl paraoxon with human recombinant acetylcholinesterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *221*, 243-250.
- <sup>20</sup> Musilek, K.; Holas, O.; Jun, D.; Dohnal, V.; Gunn-Moore, F.; Opletalova V.; Dolezal, M.; Kuca, K. Monooxime reactivators of acetylcholinesterase with (E)-but-2-ene linker: preparation and reactivation of tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6733-6741.
- <sup>21</sup> Svoboda, Z.; Květina, J.; Herink, J.; Bajgar, J.; Bartošová, L.; Palička, V.; Živný, P. Galantamine antiacetylcholinesterase activity in rat brain influenced by L-carnitine. *Biomed. Pa.p Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc Czech. Repub.* **2005**, Dec, *149*, 335-337.
- <sup>22</sup> Marrs, T.C. Organophosphate poisoning *Pharmacol. Therap.* **1993**, *58*, 51-65.
- <sup>23</sup> Musílek, K.; Holas, O.; Hambálek, J.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Doležal, M. Synthesis of bispyridium compounds bearing propane linker and evaluation of their

reactivation activity against tabun and paraoxon inhibited acetylcholinesterase. *Letters in Organic Chemistry*. **2006**, 3, 831-835.

<sup>24</sup> Musílek, K.; Kuča, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Kim T.H.; Jung Y.S.; Doležal M. Syntéza reaktivátorů fosforylované acetylcholinesterasy bis-pyridiniumdialdoximového typu s 3-oxapentanovým spojovacím řetězcem a jejich testování in vitro na modelu enzymu inhibovaného chlorpyrifosem a methylchlorpyrifosem. *Česká a Slovenská Farmacie*, **2006**, 3, 115-119.

<sup>25</sup> Kellar, K.J. Overcoming inhibitions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **2006**, 103: 13263-13264.

<sup>26</sup> Patočka, J. *Vojenská Toxikologie*. Grada Publishing: Praha, **2004**; s. 180

<sup>27</sup> Bajgar, J.; Fusek, J.; Kuča, K.; Bartošová, L.; Jun, D. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2007**, 7, 461-466.

<sup>28</sup> Kuča, K.; Jun, D.; Musílek, K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini Rev Med Chem*. **2006**, 3, 269-277.

<sup>29</sup> Musílek, K.; Jun, D.; Cabal, J.; Kassa, J.; Gunn-Moore, F.; Kuča, K. Design of a potent reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase--synthesis and evaluation of (E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide (K203). *J Med Chem*. 2007, 22, 5514-5518.

<sup>30</sup> Albuquerque, E.X.; Pereira, E.F.; Aracava, Y.; Fawcett, W.P.; Oliveira, M.; Randall, W.R.; Hamilton, T.A.; Kan, R.K.; Romano, J.A. Jr.; Adler, M. Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2006**, 35, 13220-13225.

<sup>31</sup> Pang, Y.P., Kollmeyer, T.M., Hong, F., Lee, J.C., Hammond, P.I., Haugabouk, S.P., Brimijoin, S. Rational design of alkylene-linked bis-pyridiniumaldoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. *Chem. Biol.*, **2003**, 10, 491-499.

<sup>32</sup> Bajgar, J.; Kuča, K.; Fusek, J.; Karasova, J.; Kassa, J.; Cabal, J.; Jun, D.; Blaha, V. Inhibition of blood cholinesterases following intoxication with VX and its derivatives. *J. Appl. Toxicol.* **2007**, 27, 458-463.

<sup>33</sup> Lucic, A.; Radic, B.; Peraica, M.; Mesic, M.; Primožic, I.; Binenfeld, Z. Antidotal efficacy of quinuclidinium oximes against soman poisoning. *Arch. Toxicol.*, **1997**, 71, 467-470

- <sup>34</sup> Tattersall, J.E. Ion channel blockade by oximes and recovery of diaphragm muscle from soman poisoning in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *108*, 1006–1015.
- <sup>35</sup> Musilek, K.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M.J. Two step synthesis of a non-symmetric acetylcholinesterase reactivator. *Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 425-431.
- <sup>36</sup> Musilek, K.; Holas, O.; Kuca K.; Jun D.; Dohnal, V.; Opletalova V.; Dolezal, M. Synthesis of monooxime-monocarbamoyl bispyridinium compounds bearing (*E*)-but-2-ene linker and evaluation of their reactivation activity against tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2007**, *1*, 70 – 76.
- <sup>37</sup> Francotte, P.; Graindorge, E; Boverie, S.; de Tullio, P.; Pirotte, B. New trends in the design of drugs against Alzheimer's disease. *Curr, Med, Chem*, **2004**, *11*, 1757–1778.
- <sup>38</sup> Picha, J.; Kuca, K.; Kivala, M.; Kohout, M.; Cabal, J.; Liska, F. A new group of monoquaternary reactivators of acetylcholinesterase inhibited by nerve agents. *J.Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, **2005**, *20*, 233-237.
- <sup>39</sup> Heath, D.F. *Organophosphorus Poisons. Anticholinesterases and related compounds*. Pergamon Press: Oxford , **1961**; 403.
- <sup>40</sup> Kuca, K., Patocka, J. Reactivation of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase by quaternary pyridinium aldoximes. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, **2004**, *19*, 565-570.
- <sup>41</sup> Whiteley, C.G., Ngwenya, D.S. Protein ligand interactions 7 halogenated pyridinium salts as inhibitors of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **1995**, *36*,1107-1112.
- <sup>42</sup> Cabal, J., Kuca, K., Kassa, J. Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2004**, *95*, 81-86.
- <sup>43</sup> Sakurada, K.; Matsubara, K.; Shimizu, K.; Shiono, H.; Seto, Y.; Tsuge, K.; Yoshino, M.; Sakai, I.; Mukoyama, H.; Takatori, T. Pralidoxime iodide (2-PAM) penetrates across the blood-brain barrier. *Neurochem. Res.* **2003**, *28*, 1401–1407.
- <sup>44</sup> Okuno, S.; Sakurada, K.; Ohta, H.; Ikegaya, H.; Kazui, Y.; Akutsu, T.; Takatori, T.; Iwadate, K. Blood-brain barrier penetration of novel pyridinealdoxime methiodide (PAM)-type oximes examined by brain microdialysis with LC-MS/MS. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *227*, 8-15.

<sup>45</sup> Lorke, D.E.; Hasan, M.Y.; Nurulain, S.M.; Sheen, R.; Kuca, K.; Petroianu, G.A. Entry of two new asymmetric bispyridinium oximes (K-27 and K-48) into the rat brain: comparison with obidoxime. *J. Appl. Toxicol.*, **2007**, *27*, 482-490.