

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

**SYNTÉZA BISKVARTERNÍCH NESYMETRICKÝCH
REAKTIVÁTORŮ ACETYLCHOLINESTERASY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a veškeré literární prameny a zdroje informací, které jsou v práci použity, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Hradec Králové, 2008

Markéta Komlóová

Diplomová práce byla vypracována pod odborným vedením Doc. PharmDr. Martina Doležala, Ph.D. a Mgr. Kamila Musílka, Ph.D., kterým tímto děkuji za cenné rady. Dále děkuji laborantce paní Martině Hrabinové za pomoc při testování látek.

Obsah

1	Úvod	6
2	Teoretická část	7
2.1	Acetylcholin	7
2.1.1	Nikotinové receptory (nAChR).....	7
2.1.2	Muskarinové receptory (mAChR).....	8
2.2	Acetylcholinesterasa	11
2.2.1	Struktura acetylcholinesterasy	11
2.2.2	Hydrolyza acetylcholinu	12
2.2.3	Butyrylcholinesterasa	12
2.3	Inhibice acetylcholinesterasy	14
2.4	Organofosforové sloučeniny	15
2.4.1	Struktura.....	15
2.4.2	Mechanismus účinku.....	15
2.4.3	Klinický obraz intoxikace	17
2.4.4	Terapie otrav NPL.....	18
2.5	Reaktivátory acetylcholinesterasy	20
2.5.1	Mechanismus účinku reaktivátorů acetylcholinesterasy	21
3	Experimentální část	22
3.1	Syntetická část	22
3.1.1	Obecná syntetická část	22
3.1.2	Příprava monokvarterních solí	22
3.1.3	Příprava biskvarterních solí.....	25
3.2	Stanovení reaktivačních parametrů potenciostatickou metodou <i>in vitro</i>	30
3.2.1	Princip metody	30
3.2.2	Postup měření.....	30
3.2.3	Výsledky měření	31
3.3	Stanovení afinity inhibitorů k AChE	32
3.3.1	Princip a postup stanovení	32
3.3.2	Výsledky měření	32
4	Diskuse	33
5	Závěr	35
6	Použitá literatura	37

Seznam zkratek

AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AK	aminokyselina
BCh	butyrylcholin
BChE	butyrylcholinesterasa
BuOH	butanol
CNS	centrální nervový systém
DMF	dimethylformamid
Glu	glutamin
His	histidin
IACHe	inhibitor AChE
mAChR	muskarinové acetylcholinové receptory
MeCN	acetonitril
nAChR	nikotinové acetylcholinové receptory
OP	organofosforová sloučenina
PAS	periferní anionické místo
Phe	phenylalanin
Ser	serin
Trp	tryptofan

1 Úvod

Organické sloučeniny fosforu zahrnují látky používané v zemědělství, průmyslu i medicíně. Podobnou základní strukturu mají i látky zneužívané jako chemické zbraně, tzv. nervově paralytické látky. Všechny tyto sloučeniny mohou být pro lidský organismus vysoce toxické, neboť mají schopnost inhibovat životně důležitý enzym acetylcholinesterasu. Proto se současně s jejich objevem rozvíjela i snaha o nalezení vhodných antidot, tzv. reaktivátorů acetylcholinesterasy. Navzdory intenzivnímu výzkumu se však stále nepodařilo získat reaktivátor, který by optimálně účinkoval proti všem zástupcům širokého spektra používaných organofosfátů. Vzhledem k možnosti použití nervově paralytických látek ve válkách nebo jejich zneužití k teroristickým útokům, přetrvává hrozba intoxikace těmito sloučeninami. Navíc stále dochází k výskytu otrav organofosforovými pesticidy. Snaha najít vhodné antidotum je proto vysoce aktuální.

Cílem této práce je příprava a *in vitro* testování reaktivační účinnosti devíti potenciálních biskvarterních reaktivátorů paraoxonem a tabunem inhibované acetylcholinesterasy. Jako referenční látky byly použity známé reaktivátory pralidoxim, obidoxim a HI-6. Dále byly připraveny čtyři monokvarterní inhibitory acetylcholinesterasy a byla stanovena jejich afinita k enzymu *in vitro*.

2 Teoretická část

2.1 Acetylcholin

Acetylcholin (ACh), jeden z nejdůležitějších mediátorů nervového přenosu, je hojně rozšířen jak v centrálním, tak periferním NS. Je to hlavní neurotransmitter parasymptických postgangliových vláken, avšak zajišťuje i přenos vzruchů ve vegetativních gangliích sympatiku a parasympatiku a na nervosvalové ploténce, v místě, kde somatická nervová vlákna inervují příčně pruhované svaly.

Je syntetizován v cytoplazmě neuronů z acetyl-koenzymu A a cholinu enzymem cholinacetyltransferasou. Cholin je na místo syntézy přijímán z plazmy nebo zpětně ze synaptické štěrbin, kde vzniká rozložením ACh dříve použitého k nervové stimulaci. V cholinergních nervových zakončeních je pak z větší části skladován ve vezikulech. Ty, v případě, že k nervovému zakončení dospěje akční potenciál, splývají se synaptickou membránou a dojde k masivnímu uvolnění mediátoru, který pak reaguje s receptory na postsynaptické membráně. K slabému uvolňování však dochází difúzí i bez stimulace akčním potenciálem.

Široká škála účinků ACh je umožněna mj. i heterogenitou cholinergních receptorů. Existují dva základní typy receptorů – nikotinové (nAChR) a muskarinové (mAChR), označené takto podle schopnosti přírodních alkaloidů nikotinu a muskarinu napodobovat na každém z nich účinky ACh. Pomocí selektivních antagonistů byly dále tyto dva základní typy receptorů rozděleny na dva podtypy nikotinových a pět muskarinových (1).

2.1.1 Nikotinové receptory (nAChR)

nAChR hrají hlavní úlohu při mezibuněčné komunikaci v mozku a na nervosvalovém spojení. Účastní se kognitivních funkcí CNS, jako je stav vědomí, pozornost, učení a paměť a poruchy jejich funkce mohou být příčinou, např. schizofrenie, autismu, Alzheimerovy či Parkinsonovy choroby. Poznání jejich struktury a pochopení mechanismu aktivace i inhibice je předpokladem pro terapeutické zvládnutí těchto nemocí (2).

2.1.1.1 Klasifikace a struktura

Jsou známy dva podtypy nAChR lišící se v lokalizaci a ve struktuře. Na nervosvalovém spojení jsou tzv. neuromuskulární nAChR, v mozku a na synaptických

membránách ganglií vegetativní NS jsou pak tzv. neuronální nAChR. Oba podtypy receptorů jsou ionotropní, což znamená, že jsou spřažené s iontovým kanálem (1).

Jsou tvořeny pěti podjednotkami: dvěma alfa, jednou beta, delta a gamma/epsilon, které vytvářejí pentamerní strukturu obklopující transmembránový pór, specificky propustný pro kationty Na^+ , Ca^{2+} a K^+ . Na muskulárním receptoru byl identifikován pouze jeden druh podjednotky alfa (označen jako α_1) a podjednotky beta (β_1). Na neuronálním receptoru pak bylo nalezeno širší spektrum podjednotek alfa ($\alpha_2 - \alpha_{10}$) i beta (β_{2-4}). Všechny podjednotky však mají podobnou topologii. Skládají se z velké extracelulární hydrofilní domény s N-koncem, na které jsou vazebná místa pro ACh, popř. kompetitivní inhibitory receptoru, následují tři hydrofobní transmembránové oblasti ($M_1 - M_3$), velká intracelulární klička, čtvrtá transmembránová oblast M_4 a krátký extracelulární C-konec. Transmembránový segment M_2 každé podjednotky za přispění M_1 tvoří stěnu iontového kanálu (3).

Molekula ACh se jako aktivující ligand receptoru naváže na některé z vazebných míst a spustí tím konformační změny šířící se allostericky po všech podjednotkách. Následkem toho dojde k otevření kanálu a je tak umožněn průchod kationtů přes membránu způsobující depolarizaci membrány a šíření AP. Nikotinové receptory zprostředkovávají rychlou excitační odpověď na stimulaci.

2.1.2 Muskarinové receptory (mAChR)

Nacházejí se na postsynaptické membráně efektorových buněk parasympatiku a jejich stimulace vede k širokému spektru účinků. Na periférii zprostředkovávají např. řízení činnosti srdce, hladkých svalů, exokrinních žláz, v CNS jsou zahrnuty do regulace teploty, procesu učení a paměti (1).

Patří do rozsáhlé rodiny metabotropních receptorů, čili receptorů spřažených s G-regulačním proteinem. Mohou zprostředkovávat jak excitační, tak inhibiční odpověď, která je však v porovnání s ionotropními receptory pomalejší.

2.1.2.1 Struktura

Receptory spojené s G-proteiny vykazují vysoký stupeň homologie u všech živočišných, a pravděpodobně i rostlinných buněk. Všechny jsou tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem, který má sedm transmembránových úseků a na intracelulárních smyčkách se nalézají funkční komponenty umožňující vazbu G-

proteinu. Ten je na vnitřní straně membrány k receptoru přidružen a má funkci transduceru. Strukturně jde o trimer, tvořený podjednotkou α , která má schopnost vázat na sebe a štěpit guanosintrifosfát (GTP, odtud název G-protein) a aktivovat další složky kaskády, známé jako druhé posly, a podjednotkami β a γ , jejichž funkcí je zakotvení proteinu v membráně (4).

U většiny G-proteinů je komplex β a γ funkčně shodný a pouze odlišnosti ve stavbě a tudíž i funkci α podjednotky určují typ proteinu. Rozlišujeme 4 základní třídy G-proteinů: G_i , G_s , $G_{q/11}$ a $G_{12/13}$.

2.1.2.2 Klasifikace mAChR

Pomocí selektivních agonistů a antagonistů, a za přispění metod molekulární biologie, zahrnujících expresi genů kódujících tyto receptory, se podařilo charakterizovat 5 podtypů mAChR, označovaných jako M_{1-5} . Strukturálně vykazují výraznou homologii. Pro funkci nejzásadnější je zřejmě odlišnost v místě, ke kterému se po aktivaci receptoru přidružuje G-protein. Tyto odlišnosti způsobují, že receptory M_1 , M_3 a M_5 se spojují s proteinem typu $G_{q/11}$ a M_2 a M_4 s G_i -proteinem. To se pak dále odráží v aktivaci jiných druhých poslů a tudíž i celkové odpovědi na stimulaci. Výskyt jednotlivých typů mAChR, některé jejich funkce a zástupci agonistů a antagonistů jsou pro větší přehlednost shrnuty v Tabulce 1.

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

Tabulka 1: Muskarinové receptory – základní data.

2.2 Acetylcholinesterasa

Účinek ACh je velmi rychlý a krátký. Molekula ACh poměrně rychle disociuje od receptoru, a aby působila v synaptické štěrbině jen po nezbytně nutnou dobu, je zde přítomen enzym acetylcholinesterasa (AChE; EC 3.1.1.7), odpovědný za jeho degradaci.

AChE patří do skupiny cholinesteras, to je obecný termín pro enzymy s vyšší afinitou k esterům cholinu než k jiným esterům. V lidském těle se nacházejí dva typy cholinesteras, lišící se od sebe výskytem i funkcí: již zmíněná AChE, dále pak butyrylcholinesterasa (BChE), také známá jako plazmová, nebo nespecifická esterasa.

AChE je lokalizována především v nervových zakončeních, ale lze ji nalézt i v membráně erytrocytů, slinivce a plicích. Byla považována za výhradně membránově vázaný glykoprotein, ale další studie poukazují na výskyt tzv. sekreční formy, vyskytující se v místech nevyžadujících hydrolýzu ACh a předpokládá se, že tato forma AChE plní další nekatalytické funkce, zahrnující mj. regenerační procesy neuritů (5), synaptogenezi a růst axonů (6). Mechanismy těchto procesů zatím však zůstávají neznámé (7).

2.2.1 Struktura acetylcholinesterasy

AChE byla izolována ve své monomerní, dimerní i tetramerní formě, z nichž za funkčně nejvýznamnější při fyziologických podmínkách je považována forma tetramerní (8).

Monomerní AChE má molekulovou hmotnost přibližně 60 000. Řadí se mezi α/β hydrolasy a sestává z 12 centrálních beta listů propojených 14 alfa helixy (10). Aktivní místo enzymu je tvořeno dvěma podjednotkami: esteratickou a anionickou. Esteratická je složená z tzv. katalytické triády aminokyselin (AK) serinu (Ser), histidinu (His) a glutaminu (Glu). Anionická část, představovaná aminokyselinami tryptofanem (Trp), fenyloalaninem (Phe) a Glu, interaguje s kladně nabitou trimethylamoniovou skupinou ACh a je odpovědná za správnou orientaci substrátu vzhledem k aktivnímu místu enzymu (11).

Podrobnější studie trojrozměrné struktury enzymu umisťují aktivní místo ke dnu úzké a zdánlivě těžko přístupné prohlubně, zasahující až 20 Å pod povrch enzymu (10). Dále je upozorňováno na vysoký stupeň aromaticity v okolí aktivního místa a je

zpochybňován význam anionického místa, přesněji jeho části se záporným nábojem, pro vazbu substrátu (12). Zatímco výskyt AK Trp se ukázal pro efektivitu enzymu jako zásadní (předpokládá se, že ACh je stabilizován v požadovaném místě pomocí kation- π interakcí), odstranění záporně nabitých AK na ni neměl významný vliv (13, 14). Je tedy otázkou, nakolik jsou za ukotvení substrátu odpovědné elektrostatické interakce anionického místa a Ach (15). Bylo však poukázáno i na to, že na elektrostatických interakcích se nemusí podílet pouze formální náboje v okolí aktivního místa. Celkový dipólový moment, který makromolekula enzymu vykazuje, může také hrát významnou roli při navádění substrátu k místu reakce (16).

2.2.2 Hydrolýza acetylcholinu

Při hydrolýze je karbonylový uhlík ACh vystaven nukleofilnímu ataku hydroxylovou skupinou serinu v aktivním místě AChE a vytváří se dočasná kovalentní vazba mezi enzymem a substrátem. Imidazolový dusík další AK katalytické triády histidinu může vytvářet vodíkovou vazbu s hydroxylem serinu a tak podpořit reakci (17). Uvolňuje se cholin, který je aktivně vychytáván zpět do presynaptického neuronu, kde je využit k další syntéze ACh, a enzym zůstává krátkodobě acetylován. Velmi rychle však dochází ke spontánní hydrolýze acetylové skupiny a znovuobnovení katalytického místa, čímž je umožněna výjimečně vysoká efektivita enzymu.

Zajímavé je, že AChE podléhá inhibici, způsobené vysokou koncentrací substrátu, což ji odlišuje od strukturně výrazně homologní BChE. Tato substrátová inhibice je zřejmě důsledkem existence dalšího vazebného místa pro substrát, tzv. periferního anionického místa (PAS), nacházejícího se na okraji prohlubně s aktivním místem (18). Vazba ligandů na PAS může allostericky ovlivňovat katalytickou aktivitu enzymu. Dále byl navržen mechanismus inhibice zahrnující dvě molekuly ACh, z nichž jedna acetyluje aktivní místo a druhá vazbou na PAS zamezuje přístupu molekuly vody, potřebné k deacetylaci (19). Navzdory různým teoriím však zůstává molekulární podstata substrátové inhibice zatím nedeřešena.

2.2.3 Butyrylcholinesterasa

Butyrylcholinesterasa (BChE; EC 3.1.1.8), nazývaná též pseudocholinesterasa, nescifická nebo sérová esterasa, patří stejně jako AChE do skupiny serinových hydrolas. S AChE vykazuje 65% homologii v sekvenci AK (20) i podobnou odpověď na některé klasické inhibitory AChE. Odlišnosti jsou však jak v distribuci, tak preferenci některých substrátů (21). BChE hydrolyzuje butyrylcholin (BCh) 4x rychleji

než ACh. Charakteristickou vlastností BChE také je, že nepodléhá substrátové inhibici, ale naopak se při nadbytku substrátu projevuje aktivací (22).

BChE se vyskytuje volně v plazmě, játrech, střevech, srdci, hladkém svalů a slinivce a v omezeném rozsahu i v neuronech periferní a centrální NS (23).

Hlavní fyziologická funkce BChE je stále neznámá. Význam je však připisován roli BChE jako scavengeru některých nebezpečných inhibitorů AChE (organofosfátů, karbamátů). Dále schopnosti regulovat cholinergní transmissi při absenci AChE, inaktivovat některá xenobiotika (kokain, acetylsalicylová kyselina) a aktivovat jiná (bambuterol, heroin). Některé studie se také zabývají možnou souvislostí mezi peptidasovou aktivitou BChE a rozvojem Alzheimerovy choroby (AD). Aktivita BChE totiž s věkem narůstá a navíc je její výskyt u pacientů s AD zvýšen. Nález BChE v β -amyloidních placích podporuje možnost, že se podílí na produkci β -amyloidních proteinů (24).

2.3 Inhibice acetylcholinesterasy

Rychlá hydrolýza ACh je zásadní pro zachování přesnosti signálu a udržení působení ACh ve fyziologických mezích. Látky, které modulují efektivitu AChE ve smyslu snížení její aktivity, se nazývají inhibitory AChE (IAChE). Princip účinků všech IAChE je podobný. Téměř všechny inhibitory se podobně jako ACh vážou na enzym kovalentní vazbou, čímž zamezí přístupu ACh k aktivnímu místu. Navíc zpětná hydrolýza komplexu enzym – inhibitor je oproti hydrolýze enzym – ACh zpomalena. Chemická struktura inhibitoru je hlavní determinantou délky trvání jeho účinků. Podle něho se inhibitory dělí na:

- reversibilní – estery kyseliny karbamové s alkoholy (fysostigmin, neostigmin), v závislosti na použité látce trvá hydrolýza 30 min až 6h
- ireversibilní – (přesněji quasi-ireversibilní) organofosforové sloučeniny (OP), hydrolýza trvá až stovky hodin (1)

Nahromadění ACh v synaptických štěrbinách pak může mít v závislosti na míře reversibility inhibice enzymu účinky nepříznivé, až letální, nebo naopak terapeutické. Příkladem terapeutického využití inhibice AChE je např. léčba myastenia gravis, autoimunitního onemocnění, při kterém jsou nikotinové muskulární receptory napadány tělními protilátkami. To vede ke snížení jejich životnosti a neadekvátní odpovědi na signalizaci ACh, následované svalovou slabostí. Zesílení a prodloužení účinků ACh reversibilními inhibitory je pak využíváno jak k diagnóze, tak i k terapeutickému zvládnutí nemoci. Dále lze reversibilní inhibitory využít k prevenci a léčbě atonií GIT a močových cest, snížení nitroočního tlaku při glaukomu nebo ke zpomalení rozvoje AD (25).

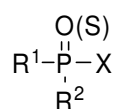
Irreversibilní inhibitory naopak pro svou toxicitu nevlastní významný terapeutický potenciál a jejich význam je především toxikologický.

2.4 Organofosforové sloučeniny

Vůbec první sloučenina OP struktury byl tetraethylpyrofosfát syntetizovaný v polovině 19. století ve Francii. Na konci 19. století se objevila první sloučenina s přímou vazbou fosfor-uhlík a v dalším století pak bylo v poměrně krátkém časovém rozmezí připraveno na 2 tis. OP, původně zamýšlených pro využití v zemědělství jako pesticidy. Brzy však byl odhalen jejich toxický potenciál, předurčující je k dalšímu využití jako chemické bojové látky, tzv. nervově paralytické látky (NPL), z nichž nejznámějšími představiteli jsou sarin, soman, tabun a VX (Obr.2) (26). Vojenské mocnosti jich vyrobily v průběhu války obrovské zásoby, které však nakonec nebyly použity. Vzhledem k jejich vysoké toxicitě a poměrně snadné a levné výrobě stále přetrvává potenciální hrozba jejich použití ve válkách nebo při teroristických útocích. V rozvojových zemích navíc dochází k poměrně častým otravám OP pesticidy.

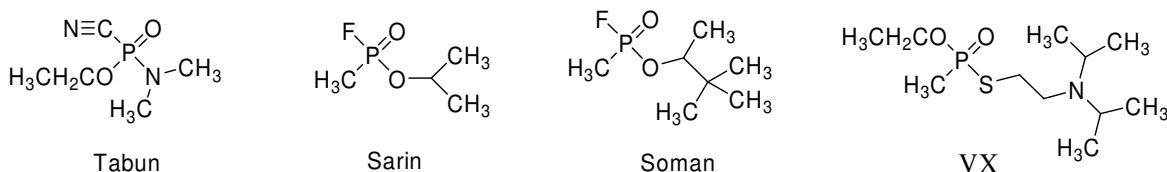
2.4.1 Struktura

Nejčastěji se jedná o organické sloučeniny kyseliny fosforečné a fosfonové. Dále pak méně toxické sirmé analogy odvozené od kyseliny thiofosforečné a thiofosfonové (Obr.1) (27).



Obrázek 1 Obecná chemická struktura znázorněna Schraderovým vzorcem

R^1 a R^2 mohou být alkyly, alkoxyly, alkylthio nebo amino skupiny, substituent X může být halogen, kyano nebo thio skupina. Reaktivita je dána hlavně elektrofilitou fosforu a závisí na chemické struktuře. Substituenty, které zvyšují reaktivitu jsou halogeny a dále nitro, kyano, keto a esteratická skupina, naopak deaktivující vliv má hydroxylová a karboxylová skupina (28).



Obrázek 2 Příklady struktur některých NPL

2.4.2 Mechanismus účinku

Průnik do organismu je usnadněn vysokou lipofilitou a těkavostí OP. Po vstupu jsou transportovány na místo toxického účinku krevním oběhem, kde však dochází

k vysokým ztrátám, neboť zde OP reagují s BChE a dalšími enzymy, jejichž inhibice na rozdíl od inhibice AChE nevyvolává žádné klinické příznaky. Na místo toxického efektu je tedy díky těmto scavengerům dopraven jen velmi malý zlomek původního množství dávky. Ten je navíc redukován biotransformací (34).

Biotransformace je v první fázi představována oxidativním procesem, který však nemusí nutně znamenat deaktivaci a může způsobit vznik produktu více toxického než byl původní substrát, jako je tomu například u přeměny pesticidu parathion na paraoxon (Schéma 1). Tento proces se označuje jako letální syntéza (34).

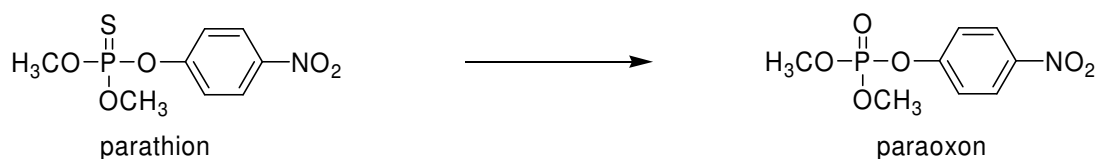


Schéma 1 Schéma oxidativní desulfurace parathionu na paraoxon v první fázi biotransformace

Druhá fáze biotransformace je fáze konjugační, OP podléhá konjugaci s endogenním substrátem, kterým bývá nejčastěji glukuronová nebo sulfonová kyselina, čímž vzniká hydrofilnější produkt, který je snadněji vyloučen z těla (29).

Předpokládá se, že vlastní toxický efekt je realizován 1 – 3 % z původní dávky OP (34). Elektrofílní molekula OP fosforyluje enzym tvorbou kovalentní vazby přes serinový hydroxyl v aktivním místě za uvolnění X substituentu (Schéma 2) (28).

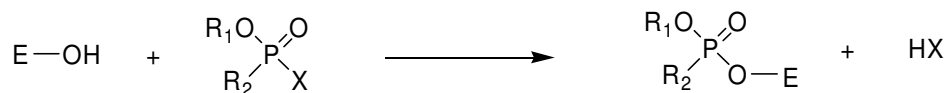


Schéma 2 Schéma fosforylace enzymu

Fosforylovaný enzym je pak velmi stabilní a jeho regenerace spontánní hydrolýzou je pomalá nebo téměř žádná. Může být reaktivován jen pomocí velmi silně nukleofilních sloučenin (tzv. reaktivátorů AChE). Reaktivaci ale komplikuje proces tzv. stárnutí. Jde o dealkylaci fosforylové části komplexu enzym-inhibitor a její interakci s další AK aktivního místa. Takto stabilizovaný komplex enzym-inhibitor je pak odolný proti reaktivaci a fosforylace se stává již plně ireversibilní (30). Rychlost dealkylace závisí na chemické struktuře inhibitoru. Z NPL nejrychleji dealkyluje AChE inhibovaná somanem (poločas dealkylace se pohybuje v řádu minut) (34).

Inhibice AChE vede ke kumulaci ACh a nadměrnému dráždění cholinergních receptorů, které může vyústit až v k cholinergní krizi. OP navíc mohou mít i přímý vliv na cholinergní receptory a způsobit jejich poškození (31).

2.4.3 Klinický obraz intoxikace

Expozice OP je následována akutní cholinergní krizí, která zahrnuje příznaky vyplývající z nadměrné stimulace muskarinových a nikotinových receptorů.

2.4.3.1 Muskarinové příznaky

Mióza, poruchy akomodace, zvýšená sekrece žláz (hypersalivace, pocení a slzení), zvýšená motilita GIT, bronchokonstrikce a zvýšená sekrece bronchiálních žláz, hypotenze a bradykardie.

2.4.3.2 Nikotinové příznaky

Svalová ochablost a třes, tonicko – klonické křeče následované paralýzou kosterního svalstva, srdeční fibrilace.

2.4.3.3 Centrální příznaky

Napětí, neklid, deprese, závratě, zmatenost, deprese dechových a kardiovaskulárních center v prodloužené míše, což bývá spolu s paralýzou dýchacích svalů hlavní příčina smrti v případě těžkých intoxikací.

2.4.3.4 Nespecifické účinky

U NPL byly pozorovány i účinky nesouvisející přímo se zásahem do cholinergního přenosu nervového vzruchu. Jsou označovány jako nespecifické nebo necholinergní a zahrnují zásah do metabolismu bílkovin a nukleových kyselin, ovlivnění imunity a hepatotoxický efekt. Popsán byl i zásah ledvinových funkcí, vodního a minerálního metabolismu. Účinky necholinergní se na rozdíl od cholinergních manifestují se zpožděním.

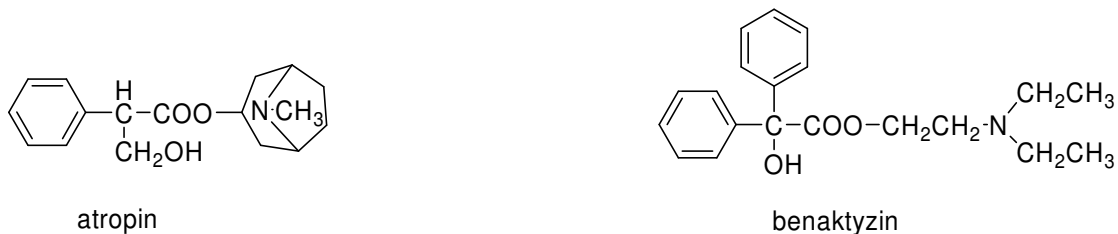
Při překonání akutní cholinergní krize zůstává organismus zatížen následky dlouhodobé hypoxie a acidózy a celé měsíce po intoxikaci mohou přetrvávat neurologické příznaky, jako jsou poruchy spánku, úzkostné až depresivní stavy a poruchy paměti, učení a koncentrace. Specifickou komplikací otrav NPL může být remise otravy daná vyplavením NPL z depotních míst nebo jejich dodatečným uvolněním z vazby na krevní bílkoviny.

Některé OP navíc mohou vyvolat tzv. pozdní neurotoxický efekt. Je způsoben inhibicí tzv. neurotoxické esterázy a histologickými změnami v periferních neuronech, zahrnujícími degradaci myelinu a degeneraci axonů. Rozvíjí se po akutní intoxikaci následované několika týdny bezpříznakového období. Manifestuje se bolestí a parestezií končetin, křečím a následnou proximálně se šířící paralýzu svalů. Následná denervace vede až k těžké atrofii svalů horních i dolních končetin (34).

2.4.4 Terapie otrav NPL

První pomoc při otravě NPL by kromě zabezpečení základních životních funkcí měla zahrnovat i co nejrychlejší podání specifických antidot. Antidotní terapie obsahuje tři složky:

Funkční antidotum – anticholinergní látka, která obsazením cholinergních receptorů zamezuje jejich nadměrné stimulaci nahromaděným ACh. Lékem volby je i.v. nebo i.m. podaný atropin (Obr.3), který antagonizuje účinek ACh především na periferních muskarinových receptorech. Menší vliv má na centrální příznaky, neboť obtížně prochází HEB, proto bývá kombinován s druhým anticholinergikem s centrálním účinkem (např. benaktyzin).



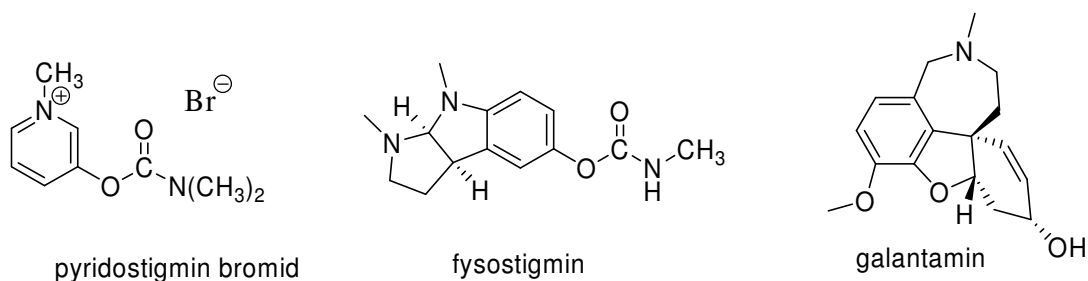
Obrázek 3 Příklady struktur používaných funkčních antidot

Kauzální antidotum – reaktivátor AChE, který obnovuje aktivitu AChE a umožní návrat k normálnímu cholinergnímu přenosu. Nejběžnější ve světě používané reaktivátory jsou pralidoxim, obidoxim, methoxim, trimedoxim a HI-6.

Antikonvulzivní složka – doplňuje antidotní terapii z důvodu omezení záchvatů CNS vedoucím ke generalizovaným tonicko - klonickým křečím a následnému poškození struktur CNS. Lékem volby je diazepam, ale uvažuje se současně o použití alprazolamu nebo klonazepamu. (34).

Kromě této kombinace antidot, která je používána k léčbě akutní intoxikace, se navíc ukazuje jako racionální profylaktické použití reversibilních inhibitorů AChE

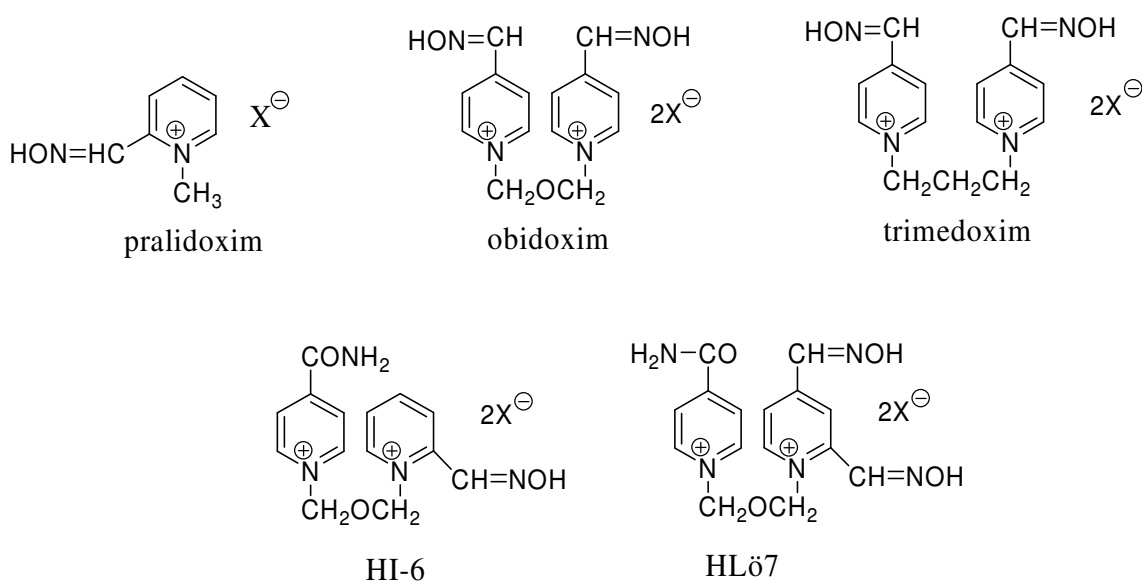
(Obr. 4) v případě předpokládané hrozby intoxikace. Reversibilní inhibitor se sám váže na enzym, zabrání tak vazbě OP a tím ho ochrání před dlouhodobou inhibicí. S tímto záměrem byl například použit pyridostigmin, jehož molekula má ale kladný náboj a díky tomu neprochází do CNS. Proto jej lze použít jen k předcházení periferních příznaků intoxikace, především svalové paralýze. Jako vhodný zástupce reversibilního inhibitoru pronikajícího HEB se jevil fysostigmin, avšak ukázalo se, že má v dávkách nutných k profylaxi řadu nežádoucích účinků (32). Nadějným kandidátem k předcházení otrav OP se zdá být galantamin. Má vyšší efektivitu než pyridostigmin a navíc účinkuje i když je podán se zpožděním po expozici OP (33). Použití reversibilních inhibitorů jako profylaxe i jako možných antidot je však stále předmětem výzkumu (25).



Obrázek 4 Příklady struktur reversibilních inhibitorů AChE

2.5 Reaktivátory acetylcholinesterasy

První úspěšná *in vitro* defosforylace inhibované AChE byla docílena pomocí hydroxylaminu v polovině 20. století (26). V následujících letech nastal poměrně intenzivní vývoj dalších specifických antidot, vycházející z předpokladu, že regenerace fosforylovaného enzymu může být dosaženo nukleofilním atakem sloučeninou strukturálně podobnou ACh. První testovaný reaktivátor ze skupiny monopyridiniových oximů, pralidoxim (2-PAM), dokázal reaktivovat enzym milionkrát rychleji než hydroxylamin (35). Následně byly syntetizovány bispyridiniové sloučeniny, reprezentovány reaktivátory obidoximem, trimedoximem, HI-6 a HLö-7 (Obr.5).



Obrázek 5 Příklady struktur reaktivátorů AChE

Jsou známy jisté vztahy mezi strukturou a reaktivačním potenciálem reaktivátoru. Jde o čtyři strukturální znaky, které ovlivňují jeho afinitu k inhibované AChE: přítomnost kvarterního dusíku (přičemž biskvarterní sloučeniny dosahují vyšší afinity než monokvarterní) (36), přítomnost nukleofilní oximové skupiny (37), a její pozice na pyridinovém jádru (obecně je vhodnější pozice 2 a 4) (38) a u bispyridiniových sloučenin délka spojovacího řetězce mezi oběma pyridinovými jádry (39).

Navzdory intenzivnímu výzkumu není mezi širokým spektrem testovaných reaktivátorů zástupce, který by měl schopnost dostatečně efektivně reaktivovat AChE nezávisle na chemické struktuře použitého inhibitoru.

Výběr nejvhodnějšího oximu je navíc ovlivněn i jeho dalšími vlastnostmi, jako jsou schopnost proniknout v dostatečném množství do CNS, přímý farmakologický účinek projevující se presynaptickým ovlivněním uvolňování ACh (40), vlastní toxicita a chemická stabilita (41).

2.5.1 Mechanismus účinku reaktivátorů acetylcholinesterasy

Kladně nabitá část molekuly reaktivátoru nasměřuje sloučeninu k aktivnímu místu enzymu, podobně jako je tomu u molekuly ACh. Zde pak silně nukleofilní oximová skupina atakuje atom fosforu OP residua a krátkodobě se vytvoří velmi nestabilní komplex enzym – inhibitor – oxim. Ten se následně rozštěpí na regenerovaný enzym a fosforylovaný oxim (Schéma 3) (41).

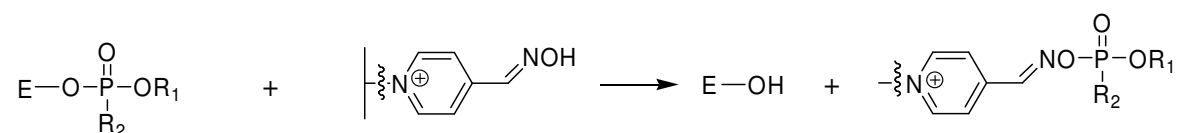


Schéma 3 Schéma mechanismu účinku reaktivátorů AChE

3 Experimentální část

3.1 Syntetická část

3.1.1 Obecná syntetická část

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

NMR spektra byla měřena na Varian Gemini 300 (¹H 300 MHz, ¹³C 75 MHz, Palo Alto CA, USA). Chemické posuny pro ¹H i ¹³C spektra jsou uvedeny v ppm (δ) v poměru k signálu rozpouštědla DMSO (δ 2,50 pro ¹H; δ 39,43 pro ¹³C). Signály jsou uvedeny jako s (singlet), d (dublet), t (triplet) a m (multiplet).

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

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

3.1.2 Příprava monokvarterních solí

Dvě metody byly použity k přípravě monokvarterních solí.

Metoda 1

Roztok hydroxyiminomethylpyridinu (4,0 g, 32,8 mmol) a dibromopropanu (16,69 ml, 163,8 mmol) v acetonu (30 ml) byl zahříván na 60 °C po dobu 8 hodin. Poté

byla směs ochlazena na laboratorní teplotu, surový produkt byl odfiltrován za sníženého tlaku a rekrystalizován z MeCN (Schéma 4).

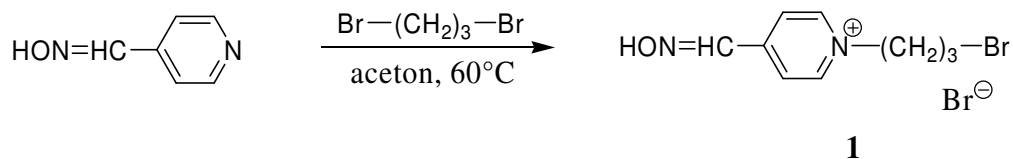
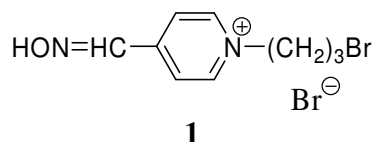


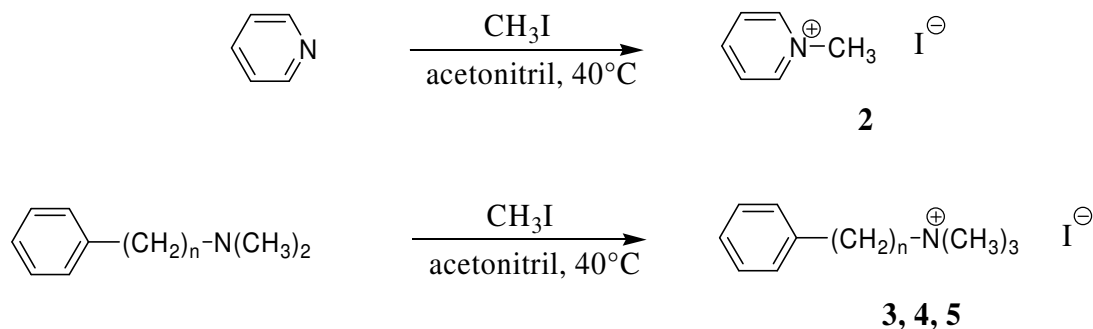
Schéma 4 Příprava monokvarterní soli Metodou 1

1-(3-bromopropyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid (**1**): výtěžek 86 %. T.t. 179-184 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) se shoduje s literaturou (44). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): d (ppm) 148,45; 145,19; 145,04; 124,02; 58,91; 32,98; 30,15. EA: vypočteno 33,36 % C; 3,73 % H; 8,65 % N; nalezeno 33,26 % C; 3,84 % H; 8,80 % N. ESI-MS: m/z 243,1 [M]⁺ (kalkulováno pro [C₉H₁₂BrN₂O]⁺ 243,01) (42).



Metoda 2

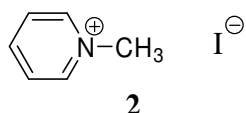
Reakční směs tvořená pyridinem, resp. terc. aminem a methyljodidem rozpuštěných v acetonitrilu (MeCN; 10 ml) byla zahřívána po dobu 5-17 hodin při 40 °C a poté ochlazena na laboratorní teplotu. Produkt byl filtrován za sníženého tlaku, další podíl produktu byl vysrážen etherem z filtrátu a odfiltrován za sníženého tlaku. Surový produkt byl rekrystalizován z dichlormethanu (Schéma 5).



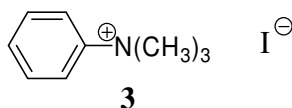
Sloučenina	n
3	0
4	1
5	2

Schéma 5 Příprava monokvarterních solí Metodou 2.

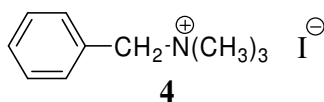
1-methylpyridinium-jodid (**2**): zahříváno 8 hodin. výtěžek 60 %. T.t. 117-119 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9,0 (d, 2H, $J = 5,6$ Hz, H-2,6); 8,59 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-4); 8,14 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H-3,5); 4,36 (s, 3H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 146,25; 145,75; 128,37; 48,67. EA: vypočteno 32,60 % C; 3,65 % H; 6,34 % N; nalezeno 32,59 % C; 3,7 % H; 6,28 % N. ESI-MS: m/z 94,1 $[\text{M}]^+$ (kalkulováno pro $[\text{C}_6\text{H}_8\text{N}]^+$ 94,07).



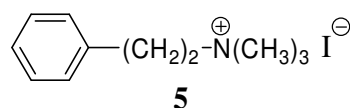
Fenyltrimethylamonium-jodid (**3**): zahříváno 13 hodin. výtěžek 94 %. T.t. 229-232 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 7,99 (d, 2H, $J = 7,7$ Hz, H-2,6); 7,61 (m, 3H, H-3, 4, 5); 3,63 (s, 9H, $\text{N}-(\text{CH}_3)_3$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 147,13; 130,05; 129,94; 120,33; 56,28. EA: vypočteno: 41,08 % C; 5,36 % H; 5,32 % N; nalezeno 41,22 % C; 5,52 % H; 5,33 % N. ESI-MS: m/z 136,2 $[\text{M}]^+$ (kalkulováno pro $[\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}]^+$ 136,11).



Trimethylfenylmethylamonium-jodid (**4**): zahříváno 6 hodin. výtěžek 90 %. T.t. 179-183 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 7,54 (m, 5H, H-Ph); 4,57 (s, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2$); 3,04 (s, 9H, $\text{N}-(\text{CH}_3)_3$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 132,97; 130,48; 129,11; 128,51; 67,80; 51,91. EA: vypočteno 43,34 % C; 5,82 % H; 5,05 % N; nalezeno 43,46 % C; 5,94 % H; 5,08 % N. ESI-MS: m/z 150,1 $[\text{M}]^+$ (kalkulováno pro $[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}]^+$ 150,13).



Trimethylfenylethylamonium-jodid (**5**): zahříváno 17 hodin. výtěžek 89 %. T.t. 230-234 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 7,34 (m, 5H, H-Ph); 3,55 (m, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$); 3,15 (s, 9H, $\text{N}-(\text{CH}_3)_3$); 3,05 (m, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 136,46; 129,17; 128,86; 127,13; 65,95; 52,48; 28,66. EA: vypočteno 45,37 % C; 6,23 % H; 4,81 % N; nalezeno 45,36 % C; 6,38 % H; 4,82 % N. ESI-MS: m/z 164,2 $[\text{M}]^+$ (kalkulováno pro $[\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}]^+$ 164,14).



3.1.3 Příprava biskvarterních solí

1-(3-bromopropyl)-4-hydroxyiminomethylpyridinium-bromid (**1**; 0.5 g, 1.54 mmol) byl rozpuštěn v DMF (10 ml) společně s odpovídajícím pyridinovým derivátem (3.0 mmol). Směs byla zahřívána při 70-100 °C po dobu 3-12 hod. a ochlazena na laboratorní teplotu. K reakční směsi byl přidán nadbytek acetonu (50 ml) a byla uchována v chladicím boxu přes noc. Surový pevný produkt byl dekantován, kapalná část reakční směsi odlita, surový produkt převrstven MeCN (50 ml) a ponechán při l.t. přes noc. Produkt byl filtrován za sníženého tlaku a rekrystalován z MeCN (Schéma 6).

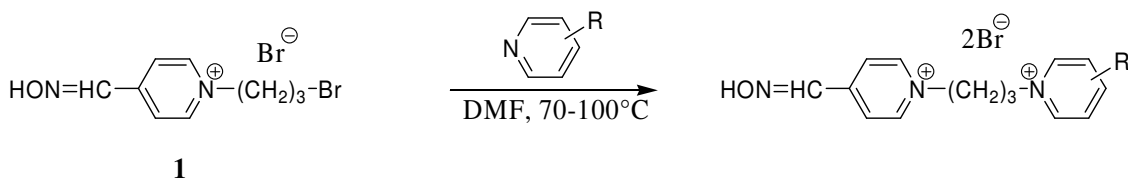
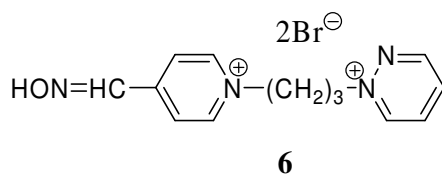
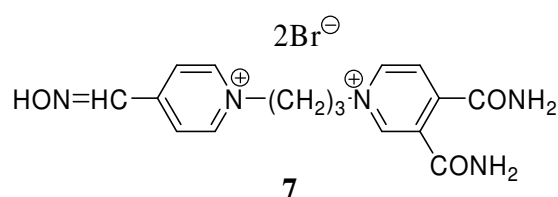


Schéma 6 Příprava biskvarterních solí

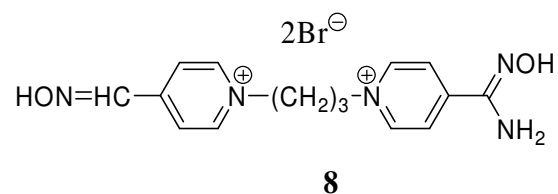
1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-pyridazinium-propan-dibromid (**6**): zahříváno 3 hod. při 100 °C. Výtěžek 92 %. T.t. 246-249 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9,86 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-6'); 9,44 (d, 1H, *J* = 4,8 Hz, H-3'); 8,91 (d, 2H, *J* = 6,0, H-2,6); 8,58 (m, 1H, H-5'); 8,44 (m, 1H, H-4'); 8,24 (s, 1H, -CH=NOH); 8,05 (d, 2H, *J* = 6,3 Hz, H-3,5); 4,75 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz, N'-CH₂-); 4,56 (t, 2H, *J* = 7,27 Hz, N-CH₂-); 2,27 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 154,47; 150,45; 148,50; 145,16; 145,06; 136,78; 136,15; 124,08; 61,02; 56,86; 30,37. EA: vypočteno 38,64 % C; 3,99 % H; 13,86 % N; nalezeno 38,47 % C; 4,12 % H; 14,02 % N. ESI-MS: *m/z* 243,1 [M-H⁺]⁺ (kalkulováno pro [C₁₃H₁₆N₄O]²⁺ 244,13).



1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(3,4-dikarbamoylpyridinium)-propan-dibromid (7): zahříváno 12 hod. při 70 °C. Výtěžek 44 %. T.t. 142-144 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9,18 (s, 1H, H-2'); 9,09 (d, 1H, *J* = 6,4 Hz, H-6'); 8,91 (d, 2H, *J* = 6,4 Hz, H-2,6); 8,24 (s, 1H, -CH=NOH); 8,13 (m, 2H, -NH₂); 8,06 (d, 2H, *J* = 6,2 Hz, H-3,5); 8,00 (d, 1H, *J* = 6,2 Hz, H-5'); 7,88 (s, 2H, -NH₂); 4,55 (m, 4H, -N-CH₂-); 2,26 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 165,40; 163,68; 150,64; 148,57; 146,39; 145,18; 145,07; 144,55; 134,10; 126,13; 124,08; 57,53; 56,92; 31,32. EA: vypočteno 39,29 % C; 3,92 % H; 14,32 % N; nalezeno 39,45 % C; 3,98 % H; 14,18 % N. ESI-MS: *m/z* 164,6 [M]²⁺ (kalkulováno pro [C₁₆H₁₉N₅O₃]²⁺ 164,58).

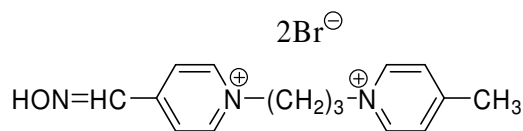


1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-[4-(1-aminohydroxyiminomethyl)-pyridinium]-propan-dibromid (8): zahříváno 8,5 hod. při 70 °C. Výtěžek 62 %. T.t. 147-149 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 8,97 (m, 4H, H-2,2',6,6'); 8,30 (s, 1H, -CH=NOH); 8,19 (d, 2H, *J* = 6,3 Hz, H-3',5'); 8,12 (d, 2H, *J* = 6,2 Hz, H-3,5); 6,31 (s, 2H, -NH₂); 4,58 (t, 4H, *J* = 6,4 Hz, -N-CH₂-); 2,34 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 148,52; 147,95; 146,93; 145,14; 145,05; 144,69; 124,08; 122,75; 56,88; 56,73; 31,48. EA: vypočteno 39,07 % C; 4,15 % H; 15,19 % N; nalezeno 39,60 % C; 4,75 % H; 15,05 % N. ESI-MS: *m/z* 150,6 [M]²⁺ (kalkulováno pro [C₁₅H₁₉N₅O₂]²⁺ 150,58).



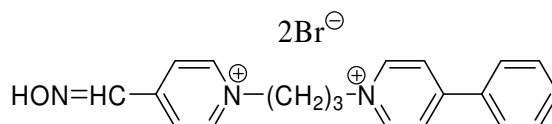
1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-methylpyridinium)-propan-dibromid (9): zahříváno 8 hod. při teplotě 70 °C. Výtěžek 53 %. T.t. 236-238 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 8,98 (d, 2H, *J* = 6,2 Hz, H-2,6); 8,88 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz, H-2',6'); 8,32 (s, 1H, -CH=NOH); 8,13 (d, 2H, *J* = 6,2 Hz, H-3,5); 7,89 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz, H-3',5'); 4,58 (m, 4H, -N-CH₂-); 2,56-2,48 (m, 2H, -N-CH₂-CH₂-); 2,47 (s, 3H, -CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 159,04; 148,50; 145,12; 145,03; 143,84;

128,35; 124,04; 56,90; 56,48; 31,52; 21,35. EA: vypočteno 43,19 % C; 4,59 % H; 10,07 % N; nalezeno 43,05 % C; 4,72 % H; 10,06 % N. ESI-MS: m/z 128,6 $[M]^{2+}$ (kalkulováno pro $[C_{15}H_{19}N_3O]^{2+}$ 128,58).



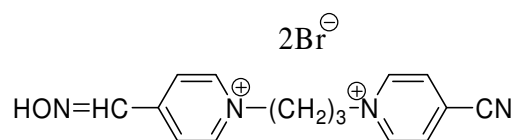
9

1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-fenylpyridinium)-propan-dibromid (**10**): zahříváno 9 hod. při teplotě 70 °C. Výtěžek 30 %. T.t. 238-240 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9,00 (d, 2H, $J = 6,4$ Hz, H-2',6'); 8,95 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-2,6); 8,39 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-3',5'); 8,27 (s, 1H, -CH=NOH); 8,08 (d, 2H, $J = 5,9$ Hz, H-3,5); 7,91 (m, 2H, H-Ph); 7,46 (m, 3H, H-Ph); 4,58 (t, 4H, $J = 7,0$ Hz, N- CH_2 - CH_2); 2,29 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 155,07; 148,78; 145,42; 145,30; 145,20; 133,67; 132,41; 129,90; 128,36; 124,75; 124,33; 57,23; 56,73; 31,83. EA: vypočteno 50,13 % C; 4,42 % H; 8,77 % N; nalezeno 48,99 % C; 4,68 % H; 8,68 % N. ESI-MS: m/z 159,6 $[M]^{2+}$ (kalkulováno pro $[C_{20}H_{21}N_3O]^{2+}$ 159,58).



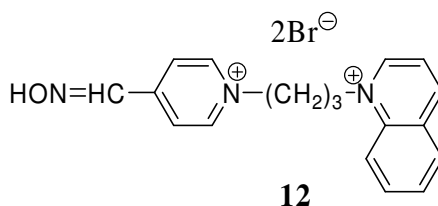
10

1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-kyanopyridinium)-propan-dibromid (**11**): zahříváno 6 hod. při 100 °C. Výtěžek 84 %. T.t. 214-218 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 9,32 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, H-2',6'); 8,94 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-2,6); 8,62 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, H-3',5'); 8,28 (s, 1H, -CH=NOH); 8,10 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-3,5); 4,67 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz, N'- CH_2 -); 4,56 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz, N- CH_2 -); 2,38-2,28 (m, 2H, - CH_2 -). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) 148,55; 146,47; 145,15; 145,06; 131,04; 126,97; 124,09; 114,77; 58,28; 56,69; 31,47. EA: vypočteno 42,08 % C; 3,77 % H; 13,09 % N; nalezeno 41,69 % C; 3,90 % H; 13,05 % N. ESI-MS: m/z 267,1 $[M-H]^+$ (kalkulováno pro $[C_{15}H_{16}N_4O-H]^+$ 267,13) (43).



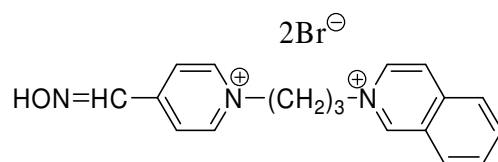
11

1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-chinoliniumpropan-dibromid (12): zahříváno 13 hod. při 70 °C. Výtěžek 57 %. T.t. 209-212 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9,70 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-2'); 9,38 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-4'); 9,02 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz, H-2,6); 8,56 (m, 2H, H-3',8'); 8,45 (s, 1H, -CH=NOH); 8,30-8,21 (m, 4H, H-3,5,5',7'); 8,06 (m, 1H, H-6'); 6,39 (m, 1H, N'-CH₂-CH₂-); 6,12 (m, 1H, N-CH₂-CH₂-); 5,87 (d, 2H, *J* = 5,1 Hz, N'-CH₂-); 5,31 (d, 2H, *J* = 6,3 Hz, N-CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 149,96; 148,60; 147,85; 144,95; 137,50; 135,63; 130,63; 129,88; 129,61; 128,31; 123,95; 122,31; 119,18; 60,29; 57,58. EA: vypočteno 47,71 % C; 4,23 % H; 9,27 % N; nalezeno 48,66 % C; 4,27 % H; 9,12 % N. ESI-MS: *m/z* 146,6 [M]²⁺ (kalkulováno pro [C₁₈H₁₉N₃O]²⁺ 146,58).



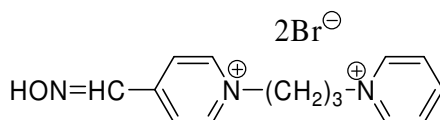
12

1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-isochinoliniumpropan-dibromid (13): zahříváno 12 hod. při 70 °C. Výtěžek 75 %. T.t. 226-229 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 10,25 (s, 1H, H-1'); 9,11 (d, 2H, *J* = 6,6 Hz, H-2,6); 8,82 (d, 1H, *J* = 6,6 Hz, H-3'); 8,65 (d, 1H, *J* = 7 Hz, H-4'); 8,57 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, H-8'); 8,47 (s, 1H, -CH=NOH); 8,39 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-5'); 8,32-8,24 (m, 3H, H-3,5,7'); 8,09 (m, 1H, H-6'); 6,30 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-); 5,52 (m, 2H, N'-CH₂-); 5,40 (m, 2H, N-CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 150,20; 148,62; 145,11; 136,98; 134,86; 131,13; 130,44; 130,19; 129,96; 127,21; 127,11; 125,80; 123,99; 60,89; 60,31. EA: vypočteno 47,71 % C; 4,23 % H; 9,27 % N; nalezeno 48,77 % C; 4,24 % H; 9,02 % N. ESI-MS: *m/z* 146,6 [M]²⁺ (kalkulováno pro [C₁₈H₁₉N₃O]²⁺ 146,58).



13

1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-pyridiniumpropan-dibromid (14): zahříváno 12 hod. při 70 °C. Výtěžek 80 %. T.t. 232-236 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 9,23-9,05 (m, 4H, 2,2',6,6'); 8,65 (m, 1H, H-4'); 8,47 (s, 1H, -CH=NOH); 8,32-8,17 (m, 4H, H-3,3',5,5'); 6,24 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-); 5,39 (m, 4H, N-CH₂, N'-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆): δ (ppm) 148,63; 145,90; 145,09; 130,22; 129,99; 128,10; 124,01; 60,68; 60,23. EA: vypočteno 41,71 % C; 4,25 %H; 10,42 % N; nalezeno 43,75 % C; 4,22 % H; 10,07 % N. ESI-MS: m/z 121,6 [M]²⁺ (kalkulováno pro [C₁₃H₁₆N₄O]²⁺ 121,57).



14

3.2 Stanovení reaktivačních parametrů potenciostatickou metodou *in vitro*

3.2.1 Princip metody

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

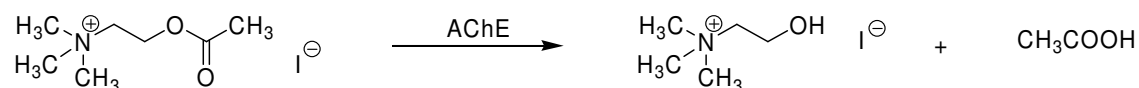


Schéma 7 Enzymatická přeměna acetylcholinu

Při reakci AChE s OP dochází k ireversibilní inhibici AChE a reakcí s oximátový aniontem k opětovné reaktivaci enzymu. Při potenciostatickém měření je roztokem NaOH titrována uvolněná kyselina octová. Ze spotřeby NaOH je možné určit aktivitu AChE (a_0), inhibované AChE (a_i) a reaktivované AChE (a_r).

3.2.2 Postup měření

Homogenát z mozků laboratorního potkana (10 % ve vodě w/v; 0.5 ml) byl smíchán s isopropylalkoholovým roztokem OP (20 μl), destilovanou vodou (0.5 ml) a inkubován ve zkumavce za teploty 25 °C po dobu 30 minut (pH 7,6) pro dosažení přibližně 95% inhibice AChE. Inkubovaná směs byla přelita do roztoku chloridu sodného (3 mol/dm³; 2,5 ml) a destilované vody (18.5 ml), zkumavka byla vypláchnuta destilovanou vodou (1 ml). Nakonec byl přidán roztok acetylcholinjodidu (0.02 mol/dm³; 2 ml). Enzymová aktivita byla měřena při pH 8,0 a teplotě 25 °C na autotitrátoru Titrando 842 (Metrohm, Švýcarsko). Aktivity intaktního (a_0) a inhibovaného enzymu (a_i) byly odečteny ze závislosti spotřeby roztoku NaOH (0.01 mol/dm³) na čase.

V případě reaktivace inhibované AChE byla směs inkubována dalších 10 minut s roztokem reaktivátoru (10⁻² mol/dm³ nebo 10⁻⁴ mol/dm³; 0.2 ml) a destilovanou vodou (0.8 ml). Poté byla inkubovaná směs přelita do roztoku chloridu sodného (3 mol/dm³; 2,5 ml) a destilované vody (17,5 ml), zkumavka byla vypláchnuta destilovanou vodou (1 ml). Byl přidán roztok acetylcholinjodidu (0.02 mol/dm³; 2 ml) a aktivita reaktivované AChE (a_r) byla opět odečtena ze závislosti spotřeby NaOH na čase. Účinnost daného reaktivátoru *in vitro* byla vypočítána podle vzorce:

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

3.2.3 Výsledky měření

Všechny reaktivátory AChE byly testovány *in vitro* při dvou koncentracích (10^{-3} mol/dm³ nebo 10^{-5} mol/dm³). Jako OP byl zvolen pesticid paraoxon a NPL tabun, jako srovnávací reaktivátory byly zvoleny HI-6, pralidoxim a obidoxim. Průměrné výsledky a jejich směrodatné odchylky dvou na sobě nezávislých *in vitro* měření pro každý reaktivátor jsou uvedeny v Tabulce 2.

Inhibitor	Reaktivace (%) ± SD			
	paraoxon		tabun	
	10 ⁻³ mol/dm ³	10 ⁻⁵ mol/dm ³	10 ⁻³ mol/dm ³	10 ⁻⁵ mol/dm ³
pralidoxim	42±1	0	4±1	0
obidoxim	76±2	37±2	11±0	0
HI-6	35±2	0	2±1	4±1
6	14±0	5±0	0	0
7	35±1	4±0	3±0	0
8	56±1	11±1	3±0	1±0
9	42±0	5±0	1±0	0
10	39±1	12±0	7±1	1±1
11	30±1	5±1	0	0
12	0	8±0	0	0
13	30±2	4±1	0	0
14	39±1	11±1	13±0	13±0

Tabulka 2 Výsledky reaktivace testovaných sloučenin (%), průměrná hodnota dvou nezávislých měření ± směrodatná odchylka).

3.3 Stanovení afinity inhibitorů k AChE

3.3.1 Princip a postup stanovení

Stanovení afinity inhibitoru vychází z měření aktivity intaktního enzymu a aktivity enzymu inhibovaného různými koncentracemi inhibitoru. Hodnoty aktivit byly zjištěny potenciostatickou metodou.

Homogenát z mozků laboratorního potkana (10 % ve vodě w/v; 0,5 ml) byl smíchán s roztokem chloridu sodného (3 mol/dm³; 2,5 ml), destilovanou vodou (19,5 ml) a vzorkem inhibitoru o koncentracích 10⁻¹-10⁻⁶ mol/dm³ (0,2 ml). Nakonec byl přidán roztok acetylcholinjodidu (0,02 mol/dm³; 2 ml). Enzymová aktivita byla měřena při pH 8,0 a teplotě 25 °C na autotitrátoru Titrand 842 (Metrohm, Švýcarsko).

3.3.2 Výsledky měření

Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nelineární regresi v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 3.

	inhibitor			
c (mol/dm ³)	2	3	4	5
8.10 ⁻⁹	0.05474	0.05389	0.06513	0.05637
8.10 ⁻⁸	0.05449	0.05377	0.06409	0.05683
8.10 ⁻⁷	0.05531	0.05331	0.06366	0.05697
2,53.10 ⁻⁶	—	0.05283	—	0.05648
8.10 ⁻⁶	0.05475	0.05238	0.06162	0.05596
2,53.10 ⁻⁵	0.05238	0.04941	—	—
8.10 ⁻⁵	0.04859	0.04681	0.05748	0.05574
2,53.10 ⁻⁴	0.04099	—	—	0.05429
8.10 ⁻⁴	0.03027	0.02048	0.04052	0.04899
AChE	0.05698	0.05581	0.06648	0.05698
IC₅₀ (mol/dm³)	0,000991	0,000437	0,002134	0,005818
95% CI (mol/dm ³)	0,00068384 – 0,001436	0,00029416 – 0,00064888	0,0008832 – 0,0051592	0,0026312 – 0,012864

Tabulka 3 Výsledky měření afinity připravených inhibitorů AChE

4 Diskuse

Reaktivační účinnost sloučenin vhodných pro *in vivo* testování by měla při testování *in vitro* přesáhnout 10 % (47). U AChE inhibované paraoxonem tuto podmínku při koncentraci 10^{-3} mol/dm³ splnily kromě sloučeniny **12** všechny testované sloučeniny. Nejvyšší účinnost při této koncentraci, převyšující i účinnost referenčních sloučenin HI-6 a pralidoximu, ne však obidoximu, byla zaznamenána u sloučeniny **8**. Při koncentraci 10^{-5} mol/dm³ byla hranice 10 % překonána pouze u tří sloučenin (**8**, **10** a **14**), ani v jednom případě však nebyla reaktivační aktivita vyšší než u referenčního obidoximu. Ostatní sloučeniny pak vykazovaly při této koncentraci nižší aktivitu. U sloučeniny **12** byla zjištěna vyšší schopnost reaktivace při nižší koncentraci reaktivátoru. Důvodem je současné inhibiční a reaktivační působení dané sloučeniny na AChE.

NPL jsou obecně silnějšími inhibitory AChE než pesticidy a reaktivovat jimi inhibovaný enzym je obtížné. Jsou známé jen dvě sloučeniny schopné překonat 10 % reaktivace při koncentraci 10^{-3} mol/dm³ – obidoxim a trimedoxim. Žádná ale nevykazuje dostatečnou reaktivační účinnost při koncentraci 10^{-5} mol/dm³ (42). Z testovaných sloučenin se jako nadějný reaktivátor jeví sloučenina **14** (48). Při obou koncentracích byla naměřena účinnost vyšší než u referenčních látek a současně přesahující hranici 10 %. Sloučenina **14** má tedy schopnost reaktivovat AChE inhibovanou tabunem i paraoxonem s dostatečnou účinností i při koncentraci 10^{-5} mol/dm³, která je vhodná pro testování *in vivo* (49).

Již dříve prováděné studie vztahu mezi strukturou a účinkem reaktivátorů považují přítomnost oximové skupiny za hlavní strukturální podmínku nutnou pro reaktivační aktivitu (37). Je to její schopnost atakovat vazbu OP-enzym, která ji činí v molekule nepostradatelnou. Přestože vyšší reaktivační účinnost vykazovala sloučenina s dvěma oximovými skupinami, jeví se přítomnost pouze jedné skupiny jako dostačující pro některé typy OP. Všechny testované látky navíc splňují další požadavky vyplývající z dokumentovaných vztahů mezi strukturou a účinkem, které jsou považovány za optimální pro aktivitu reaktivátoru, tj. přítomnost dvou kvarterních dusíků jako součástí heteroaromatických cyklů (36), oximové skupiny v poloze 4 (38) a tříčlenného spojovacího řetězce (46).

Stanovení IC_{50} je jednou z možností kvantitativního vyjádření afinity inhibitoru k enzymu. Jde o charakteristiku inhibitoru, vyjadřující míru schopnosti sloučeniny inhibovat určitý biochemický proces. IC_{50} udává koncentraci inhibitoru, při které dochází k 50% poklesu aktivity enzymu za daných podmínek. Čím nižší IC_{50} sloučenina vykazuje, tím účinnějším je inhibitorem (45). Ze stanovovaných látek se jako nejnadějnější inhibitor ukázala sloučenina **3** a nejslabším sloučenina **5**. 95% CI je tzv. interval spolehlivosti (konfidenční interval). Udává rozmezí hodnot, ve kterém se s 95% pravděpodobností vyskytuje skutečná hodnota IC_{50} .

5 Závěr

Bylo připraveno devět potenciálních biskvarterních reaktivátorů acetylcholinesterasy. *In vitro* byla stanovena jejich reaktivační účinnost na paraoxonem a tabunem inhibovaný enzym a byla porovnána s referenčními sloučeninami obidoximem, pralidoximem a HI-6. U inhibice paraoxonem dokázaly téměř všechny sloučeniny dostatečně reaktivovat při koncentraci 10^{-3} mol/dm³, sloučeniny **8**, **10** a **14** pak i při koncentraci 10^{-5} mol/dm³. Při inhibici tabunem dosáhla nejvyšší reaktivace sloučenina **14**, u které byla naměřena reaktivační aktivita převyšující referenční látky v obou koncentracích. Díky schopnosti účinně reaktivovat inhibici paraoxonem i tabunem se sloučenina **14** jeví jako velmi nadějný reaktivátor.

Souhrn

Markéta Komlóová: Syntéza biskvarterních nesymetrických reaktivátorů acetylcholinesterasy

Bylo připraveno devět potenciálních biskvarterních reaktivátorů acetylcholinesterasy a *in vitro* byla stanovena jejich reaktivační aktivita u paraoxonem a tabunem inhibovaného enzymu. Tři reaktivátory AChE se ukázaly jako vhodné k dalšímu testování proti paraoxonu. Z nich jedna sloučenina zároveň vykazovala dostatečnou účinnost i proti tabunu. Reaktivační schopnost připravených sloučenin závisí na strukturálních faktorech, jako je přítomnost oximové skupiny, její poloha, přítomnost kvarterního dusíku a dalších funkčních skupin. Dále byly připraveny čtyři monokvarterní inhibitory a *in vitro* stanovena jejich inhibiční aktivita.

Summary

Markéta Komlóová: Synthesis of bisquaternary asymmetrical reactivators of acetylcholinesterase

Nine potential bisquaternary reactivators of AChE have been prepared and their reactivation activity against paraoxon or tabun-inhibited enzyme has been tested *in vitro*. Three reactivators of AChE proved to be suitable for further testing against paraoxon. One of these compounds also demonstrated satisfactory efficiency when reacting against tabun. The reactivation abilities of prepared compounds depend on structural factors such as the presence of oxime group, its location, the presence of quaternary nitrogen and other functional groups. Also four monoquaternary inhibitors have been prepared and their inhibitive activity tested *in vitro*.

6 Použitá literatura

- (1) Lincová D., Farghali H. et al. Základní a aplikovaná farmakologie, Galén: Praha, **2002**
- (2) Changeux J. P., Edelstein S. J. Nicotinic Acetylcholine Receptor, Odile Jakob: New York, **2005**
- (3) Lindstrom J. M. Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle & Nerve* **2000** 23:453–77
- (4) Nečas, O. et al Obecná biologie, H & H: Praha, **2003**
- (5) Bigbee J. W., Sharma K. V., Chan E. L. P., Bogler O. Evidence for the direct role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth in primary dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* **2000** 861:354–362
- (6) Sternfeld M., Ming G. L., Song H. J., Sela K., Timberg R., Poo M. M. et al. Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein, and variable C termini. *J Neurosci* **1998** 18:1240–1249
- (7) Antonijevic B., Stojiljkovic M. P. Unequal Efficacy of Pyridinium Oximes in Acute Organophosphate Poisoning. *Clinical Medicine & Research* **2007** 5(1): 71-82
- (8) Massoulié J., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Morel N., Simon S.. The polymorphism of acetylcholinesterase: posttranslational processing quaternary associations and localization. *Chem. Biol. Int.* **1999** 119–120:29–42
- (9) Kua J., Zhang Y., Eslami A. C., Butler J. R., Mccammon J. A. Studying the roles of W86, E202, and Y337 in binding of acetylcholine to acetylcholinesterase using a combined molecular dynamics and multiple docking approach. *Protein Sci.* **2003** 12: 2675-2684
- (10) Caulfield M. P., Birdsall N. J. M. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol Rev* **1998** 50: 279-290
- (10) Sussman J. L., Harel M., Frolow F. et al. Atomic structure of AChE from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholinu-binding protein. *Science* **1991** 253:872-9
- (11) Quinn D.M. Acetylcholinesterase - Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition-states. *Chem. Rev.* **1987** 87: 955–979

- (12) Harel M., Schalk I., Ehret-Sabatier L., Bouet F., Goeldner M., Hirth C., Axelsen P. H., Silman I., Sussman J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993** 90:9031–9035
- (13) Gibney G., Camp S., Dionne M., MacPhee-Quigley K., Taylor P. Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1990** 87:7546–7550
- (14) Harel M., Quinn D. M., Nair H. K., Silman I., Sussman J. L. The x-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **1996** 118:2340–2346
- (15) Shafferman, A., Ordentlich A., Barak D., Kronman C., Ber R., Bino T., Ariel N., Osman R., Velan B. Electrostatic attraction by surface charge does not contribute to the catalytic efficiency of acetylcholinesterase. *EMBO J.* **1994** 13:3448–3455
- (16) Antosiewicz, J., McCammon J. A., Wlodek S. T., Gilson M. K. Simulation of charge-mutant acetylcholinesterases. *Biochemistry*. **1995** 34:4211–4219
- (17) Soreq H., Gnatt A., Loewenstein Z., Seville L. F. Excavations into the active-site gorge of AChE. *TIBS* **1992** 17:353-358
- (18) Roufogalis B.D., Quist E.E. Relative binding sites of pharmacologically active ligands on bovine erythrocyte acetylcholinesterase. *Mol Pharmacol.* **1972** 8: 41–49
- (19) Stojan J., Brochier L., Alies C., Colletier J. P., Fournier D. Inhibition of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase by high concentrations of substrate. *Eur J Biochem.* **2004** 271: 1364–1371
- (20) Allderdice P. W., Garner H. A. R., Galutira D., Lockridge O., LaDu B. N., McAlpines J. The cloned butyrylcholinesterase (BChE) gene maps to a single chromosome site. *Genomics*. **1991** 11: 452-454
- (21) Bhanumathy C. D, Balasubramanian A. S. Evidence for a Zn²⁺-binding site in human serum butyrylcholinesterase. *Biochem. J.* **1996** 315: 127-131
- (22) Main A., Soucie W., Buton I., Princ E. The purification of cholinesterase from horse serum. *Biochem. J.* **1974** 143:733-744

- (23) Dave K. R., Syal A. R., Katyare S. S. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Z. Naturforsch.* **2000** 55c: 100-108
- (24) Çokuğraş A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turkish Journal of Bioch.* **2003** 2:54-61
- (25) Kellar K. J. Overcoming inhibitions. *PNAS* **2006** 109:13263-13264
- (26) Karczmar A. G. History of the research with anticholinesterase agents. In: Karczmar AG, Usdin E., Wills J. H., eds. *Anticholinesterase agents.*: Pergamon Press: Oxford, **1970** 1-44
- (27) Amitai G., Moorad D., Adani R., Doktor B. P. Inhibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by Chlorpyrifos – oxon – Modeling and mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.* **1998** 56(3): 293-299
- (28) Srivatsan M. An analysis of acetylcholinesterase sequence for predicting mechanisms of its non-catalytic actions. *Bioinformatics.* **2006** 1(8): 281-284
- (29) Jokanovic M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* **2001** 166:139-160
- (30) Millard C. B., Kryger G., Ordentlich A. et al. Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. *Biochemistry* **1999** 38:7032-7039
- (31) Bakry N. M., el-Rashidy A. H., Eldefrawi A. T., Eldefrawi M. E.. Direct actions of organophosphate anticholinesterases on nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *J Biochem Toxicol* **1988** 3:235-259
- (32) Leadbeater L., Inns R. H., Rylands J. M. Treatment of poisoning by soman, *Fund. Appl. Toxicol.* **1985** 5: S225–S231
- (33) Albuquerque E. X., Pereira E. F. R., Aracava Y., Fawcett W. P., Oliveira M., Randall W. R., Hamilton T. A., Kan R. K., Romano J. A., Adler M. Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006** 103: 13220–13225
- (34) Patočka J. a kol. *Vojenská toxikologie*, Grada publishing: Praha, **2004**
- (35) Bismuth C., Inns R. H., Marrs T. C. Efficacy, toxicity and clinical use of oximes in anticholinesterase poisoning. In: Ballantyne B., Marrs T. C., eds. *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates.* Butterworth-Heinemann: Oxford, **1992**
- (36) Kuča K., Kassa J. A Comparison of the ability of a new bispyridinium oxime . 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-carbamoylpyridinium)butane

- dibromide and currently used oximes to reactivate nerve agent-inhibited rat brain acetylcholinesterase by in vitro methods. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2003** 18:529-535
- (37) Cabal J., Hampl F., Liska F. et al. Hydrates of quaternary ammonium aldehydes as potential reactivators of sarin-inhibited acetylcholinesterase. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1998** 63:1021-1030
- (38) Heath D. F. Organophosphorus Poisons: Anticholinesterases and Related Compounds. Pergamon Press, Oxford **1961**, pp.403
- (39) Patočka J., Bielavský J.: Affinity of bis-quaternary pyridiniumaldoximes for the active centre of intact and isopropylmethylphosphonylated acetylcholinesterase. *Coll. Czech. Chem. Commun* **1972** 37:2110-2116
- (40) Oydvin O. K., Tanso R., Aas P. Pre-junctional effects of oximes on [3H]-acetylcholine release in rat hippocampal slices during soman intoxication. *Eur J Pharmacol.* **2005** 516:227-34
- (41) Stojiljković M. P., Jokanović M. Selection Of Pyridinium Oximes As Antidotes. *Arh Hig Rada Toksikol* **2006** 57:435-443
- (42) Musilek K., Holas O., Hambalek J. Synthesis of bispyridinium compounds bearing propane linker and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon inhibited AChE. *Let. Org. Chem.* **2006** 3:831-835
- (43) Musilek K., Holas O., Kuca K. a kol. Synthesis of asymmetrical bispyridinium compounds bearing cyano-moiety and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited AChE, *Bioch. Med. Chem. Let.*, **2006** 16: 5673-5676
- (44) Cid M.H.B., Holzgrabe U., Kostenis E., Mohr K., Trankle C. *J. Med. Chem.*, **1994** 37: 1439
- (45) Cortes A., Cascante M., Cardenas M. L., Cornish-Bowden A. Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition : new ways of analysing data, *Biochem. J.*, **2001** 357: 263-268
- (46) Kuča K., Patočka J., Cabal J. Reactivation of organophosphate inhibited acetylcholinesterase activity by α,ω -bis-(4-hydroxyiminomethylpyridinium) alkanes *in vitro*. *J. Appl. Biomed.* **2003** 1:207-211

- (47) Bajgar J., Fusek J., Kuča K., Bartošová L., Jun D. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2007** 5: 461-466
- (48) Kuca1 K., Musilek K., Paar M., Jun D., Stodulka P., Hrabinova M., Marek J. Targeted Synthesis of 1-(4-Hydroxyiminomethylpyridinium)-3-pyridiniumpropane Dibromide – A New Nerve Agent Reactivator. *Molecules.* **2007** 12: 1964-1972
- (49) Tattersall J. E. Ion channel blockade by oximes and recovery of diaphragm muscle from soman poisoning in vitro, *Br. J. Pharmacol.* **1993** 108(4): 1006.-1015