

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

**Syntéza monokvarterních oxim-
hydroxamátových hybridů jako reaktivátorů
OP-inhibované acetylcholinesterasy**

(Bakalářská práce)

Autor: Kristýna Weissová
Studijní program: B1407 Chemie
Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin
Vedoucí práce: Mgr. Eugenie Nepovimová, Ph.D.

Hradec Králové

červen 2020



Zadání bakalářské práce

Autor: Kristýna Weissová

Studium: S15CH108BP

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin

Název bakalářské práce: **Syntéza monokvarterních oxim-hydroxamátových hybridů jako reaktivátorů OP-inhibované acetylcholinesterasy**

Název bakalářské práce AJ: Synthesis of monoquaternary oxime-hydroxamate hybrids as reactivators of OP-inhibited acetylcholinesterase

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Cílem práce bude syntéza monokvarterních reaktivátorů OP-inhibované acetylcholinesterasy. Strukturní základ navrhovaných molekul budou tvořit: 2-pyridinaldoxim nebo 4-pyridinaldoxim a benzhydroxamová kyselina.

Amitai, G.; Gez, R.; Raveh, L.; Bar-Ner, N.; Grauer, E.; Chapman, S. Novel bifunctional hybrid small molecule scavengers for mitigating nerve agents toxicity. *Chem.-Biol. Interact.* **2016**, 259, 187-204.

Mercey, G.; Verdelet, T.; Renou, J.; Kliachyna, M.; Baati, R.; Nachon, F.; Jean, L.; Renard, P. Y. Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 756-766.

Garantující pracoviště: Katedra chemie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: Mgr. Eugenie Nepovimová, Ph.D.

Oponent: RNDr. Dávid Maliňák, PhD.

Datum zadání závěrečné práce: 23.9.2014

Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Syntéza monokvarterních oxim-hydroxamátových hybridů jako reaktivátorů OP-inhibované acetylcholinesterasy“ vypracovala samostatně. Veškeré zdroje informací, které jsem použila k sepsání práce, byly citovány a jsou uvedeny v seznamu použité literatury.“

.....
Kristýna Weissová

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Eugenii Nepovimové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

Anotace

Daná bakalářská práce je věnována designu a syntéze monokvarterních oximových reaktivátorů. Práce je dělena na dva celky. První celek shrnuje obecné informace o organofosforových sloučeninách (pesticidy, nervově paralytické látky). Dále jsou zde popsány klinické příznaky intoxikace těmito sloučeninami. V neposlední řadě v této teoretické části jsou uvedeny možnosti ochrany a léčby výše zmíněných intoxikací. Druhý celek, který je reprezentován experimentální částí, je věnován designu představených sloučenin, syntéze meziproductů a finálních oxim-hydroxamátových reaktivátorů AChE.

Klíčová slova

acetylcholinesterasa, organofosfátové pesticidy, nervově paralytické látky, reaktivátory acetylcholinesterasy, oxim

Annotation

Given Bachelor Thesis is devoted to design and synthesis of monoquaternary oxime reactivators. The work is divided into two parts. The first part summarizes general information about organophosphorus compounds (pesticides, nerve agents). Also clinical symptoms of intoxication by these compounds are described. Last but not least, in this theoretical part, the possibilities of protection and treatment of above-mentioned intoxications are presented. The second part, which is represented by the experimental part, is devoted to design of presented compounds, synthesis of intermediates and final oxime-hydroxamate reactivators of AChE.

Keywords

acetylcholinesterase, organophosphate pesticides, nerve agents, acetylcholinesterase reactivator, oxime

Obsah

Úvod	10
1 Teoretická část	11
1.1 Obecná charakteristika organofosforových sloučenin	11
1.1.1 Nervově paralytické látky	12
1.1.2 Pesticidy	13
1.2 Mechanismus účinku organofosforových sloučenin.....	17
1.2.1 Cholinergní neurotransmise	17
1.2.2 Acetylcholin	17
1.2.3 Cholinergní receptory.....	17
1.2.4 Acetylcholinesterasa.....	18
1.2.5 Inhibice acetylcholinesterasy	19
1.3 Klinické příznaky intoxikace	20
1.3.1 Cholinergní krize	20
1.3.2 Nikotinové příznaky.....	20
1.3.3 Muskarinové příznaky	20
1.3.4 Centrální příznaky.....	20
1.3.5 Příčina úmrtí	20
1.3.6 Prognóza	21
1.4 Profylaxe intoxikace organofosforovými sloučeninami	22
1.5 Terapie otrav organofosforovými sloučeninami	23
1.5.1 Parasympatolytika	23
1.5.2 Antikonvulziva.....	23
1.5.3 Reaktivátory acetylcholinesterasy	24
2 Cíle práce	26
3 Experimentální část	27
3.1 Design	28
3.2 Syntéza jednotlivých sloučenin	31

3.2.1	Příprava methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoátu (1).....	31
3.2.2	Příprava methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoátu (2)	32
3.2.3	Příprava methyl 4-(3-bromopropyl)benzoátu (3).....	33
3.2.4	Příprava 4-(3-bromopropyl)benzoové kyseliny (4).....	34
3.2.5	Příprava 4-(3-bromopropyl)benzoyl chloridu (5).....	35
3.2.6	Příprava 4-(3-bromopropyl)- <i>N</i> -hydroxybenzamidu (6)	36
3.2.7	Příprava finálního produktu 1-{3-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]propyl}-4-[(<i>E</i>)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromidu (7)	37
3.2.8	Příprava 4-(4-bromobutyl)benzoyl chloridu (8)	38
3.2.9	Příprava 4-(4-bromobutyl)- <i>N</i> -hydroxybenzamidu (9)	39
3.2.10	Příprava finálního produktu 1-{4-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]butyl}-4-[(<i>E</i>)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromidu (10)	40
4	Diskuze.....	41
5	Závěr	43
6	Použitá literatura	44

Seznam použitých zkratk

4-PA	4-Pyridinaldoxim
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
ANS	Autonomní nervový systém
CBr ₄	Tetrabrommethan
CNS	Centrální nervový systém
CuI	Jodid mědný
C-VX	Čínská VX
DCM	Dichlormethan
DDVP	Dichlorvos
EA	Ethylacetát
eq	Ekvivalent
Et ₃ N	Triethylamin
EU	Evropská Unie
FAO	Food and Agriculture Organization
H ₂ O	Voda
HBr	Kyselina bromovodíková
HCl	Kyselina chlorovodíková
IARC	International Agency for Research on Cancer
LD ₅₀	Letální dávka
m/z	Hmotnostní spektrometrie
MetOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
NaOH	Hydroxid sodný
NH ₂ OH.HCl	Hydroxylamin hydrochlorid
NMR	Nukleární magnetická resonance

NPL	Nervově paralytické látky
OP	Organofosforové sloučeniny
OPIDN	Organofosfáty indukovaná opožděná neuropatie
OPP	Organofosforové pesticidy
$\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$	Hydroxid palladnatý na uhlíku
$\text{Pd}/(\text{PPh}_3)_4$	Tetrakis(trifenylfosfin)palladium
Pd/C	Palladium na uhlíku
PE	Petrolether
Ph_3P	Trifenylfosfín
R-VX	Ruská VX
SOCl_2	Chlorid thionylu
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
T_t	Teplota tání

Úvod

Organofosforové sloučeniny (OP) našly své uplatnění v mnoha sektorech, ať už šlo o zemědělství, průmysl, vojenství nebo farmakologii. Bohužel někteří zástupci z řad OP, konkrétně ze skupiny nervově paralytických látek (NPL), byly v minulosti zneužity i k teroristickým útokům. NPL jsou vysoce toxické sloučeniny, které nevratně inhibují enzym acetylcholinesterasu (AChE; E. C. 3.1.1.7). Stejný účinek vykazují i organofosforové pesticidy. K otravě těmito pesticidy nejčastěji dochází v důsledku nedodržení bezpečnostních pravidel, avšak výjimkou není ani zneužití organofosforových pesticidů za účelem sebevraždy.

Terapie otrav způsobena OP bývá problematická. Léčba musí být zahájena co možná nejdříve po intoxikaci. Navíc dosud nebyl vyvinut žádný reaktivátor AChE, který by byl stejně účinný při otravách různými typy inhibitorů AChE.

1 Teoretická část

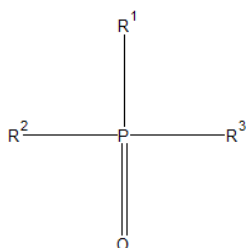
1.1 Obecná charakteristika organofosforových sloučenin

Do organofosforových sloučenin řadíme velké množství látek, které mají různé fyzikální, chemické i biologické vlastnosti. S ohledem na toxicitu, OP pokrývají prakticky celou škálu od téměř netoxických chemikálií (např. malathion) až po vysoce toxická činidla, jako je látka VX a další nervově paralytické látky. [1]

Z chemického hlediska se jedná o deriváty kyseliny fosfonové, fosforečné, amidofosforečné, nebo fosfinové. [2, 3] Tyto sloučeniny můžeme popsat obecným vzorcem, který je uveden na Obrázku 1, kde R^1 a R^2 mohou být vodík, alkyl, aryl, alkoxy, alkylthio, nebo amino skupiny.

Substituent R^3 bývá zastoupen skupinou, která se dá snadno disociovat, např. halogeny, kyano, alkylthio skupina či zbytek organické nebo anorganické kyseliny. [1]

Obrázek 1



Obrázek 1: Obecný vzorec OP

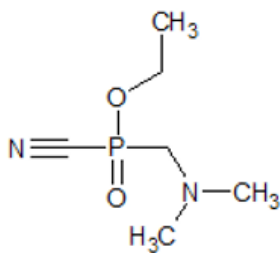
Většina OP je vysoce lipofilní, v důsledku čehož dochází k dobrému vstřebávání těchto sloučenin přes neporušenou kůži a sliznici. OP se mohou vstřebat i přes oční spojivku, gastrointestinální trakt a respirační systém. V organismu tyto sloučeniny ireverzibilně inhibují enzym AChE [4], což vede k akumulaci acetylcholinu (ACh) v synaptické štěrbině. Hromadění neurotransmiteru ACh způsobuje permanentní dráždění patřičných receptorů a následný rozvoj tzv. muskarinových a nikotinových příznaků. [3, 5]

Pro OP nacházíme široké uplatnění. Najdeme je například v zemědělství, konkrétně v pesticidech (např. parathion). V průmyslu se používají jako změkčovadla (např. trikresylfosfát). Uplatnění našly OP i ve farmakologii a medicíně coby léčiva (např. lék Mintacol). Pro své silné

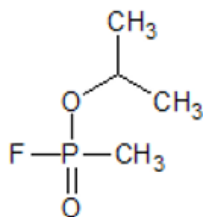
toxické účinky byly OP použity i zneužity pro válečné a teroristické účely (např. sarin). [5]
Poslední skupinu řadíme do nervově paralytických látek. [6]

1.1.1 Nervově paralytické látky

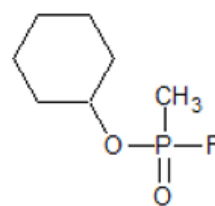
Biocidního účinku OP sloučenin si jako jeden z prvních povšiml německý vědec Gerhard Schröder, který se intenzivně věnoval vývoji nových insekticidů. Po odhalení toxického účinku daných sloučenin se výzkum firmy I. G. Farben, kde chemik Schröder pracoval, a potažmo i celý německý výzkum se přeorientoval na vývoj bojových chemických látek s nervově paralytickým účinkem. Tento výzkum byl přísně utajován a dostal krycí název „Studium organofosforových insekticidů Trilon“. Významnými produkty dané vědecké skupiny byly sloučeniny: tabun (Obrázek 2; 1936), sarin (Obrázek 3; 1939) či cyklosarin (Obrázek 4; 1949). [7] V roce 1944 byl Richardem Kuhnem a Konradem Henkelem připraven soman (Obrázek 5). [6] Po porážce Německa ve 2. světové válce se vývoje a výroby nových nervově paralytických látek chopily západní (Velká Británie, Spojené státy americké) i východní mocnosti (Sovětský svaz, Čína). [8] V roce 1952 byla britským vědcem Ranajitem Ghoshem objevena nová skupina nervově paralytických látek z řad thiofosfonátů. Nejznámějším derivátem této skupiny je látka VX (Obrázek 6). Jelikož byla chemická struktura této sloučeniny po dlouhá léta přísně utajována, v arzenálu východních mocností nalezneme deriváty látky VX pod označením ruská VX (R-VX; Obrázek 7) a čínská VX (C-VX; Obrázek 8). [7] V 70. a 80. letech 20. století byla Sovětským svazem syntetizována čtvrtá generace nervově paralytických látek pod názvem Novičok. [9]



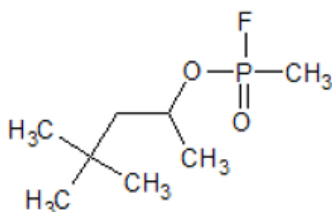
Obrázek 2: Tabun



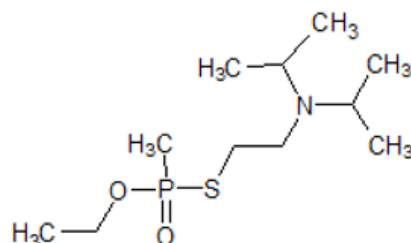
Obrázek 3: Sarin



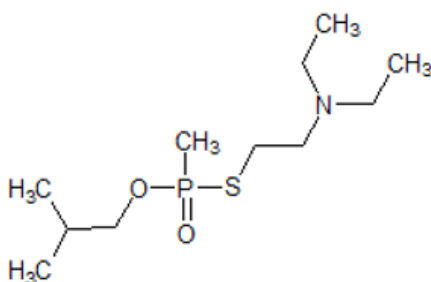
Obrázek 4: Cyklosarin



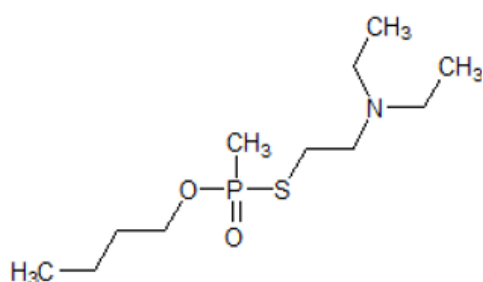
Obrázek 5: Soman



Obrázek 6: VX



Obrázek 7: R-VX



Obrázek 8: C-VX

Vzhledem k ničivému účinku bojových chemických látek vznikla mezinárodní Úmluva o zákazu vývoje, výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a o jejich zničení, která vstoupila v platnost 29. dubna 1997. [10]

1.1.2 Pesticidy

Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization, FAO) definuje pesticidy jako jakoukoli látku, nebo směs látek, které jsou určeny k prevenci, ničení nebo kontrole jakéhokoli škůdce, včetně přenašečů chorob lidí i zvířat, nežádoucích druhů rostlin a živočichů způsobující poškození během výroby, zpracování, skladování zemědělských komodit, dřeva a výrobky ze dřeva, krmiva pro zvířata. Mezi pesticidy řadíme také látky, které jsou podávány zvířatům za účelem hubení škůdců, kteří se vyskytují uvnitř, nebo vně těla zvířete. [11]

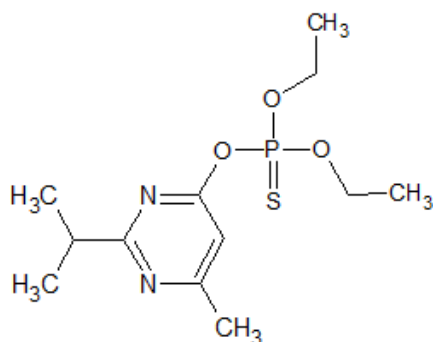
Organofosforové pesticidy (OPP) se používají ve velkém množství v zemědělství jako insekticidy, a to po celém světě. Mají sice své významné přínosy, ale zároveň vykazují i

nepříznivý vliv na zdraví člověka. Ročně je hlášeno více než 3 miliony otrav a 200 tisíc úmrtí v důsledku otrav tímto typem insekticidů. [11, 12]

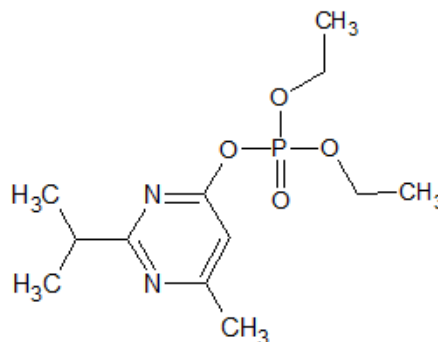
Vzhledem ke svému lipofilnímu charakteru, OPP mohou být rychle absorbovány do organismu inhalací, gastrointestinálním traktem, oční i dermální cestou. Nástup příznaků je nejrychlejší po inhalačním podání, pomalejší nástup účinků bývá při dermální absorpci, kdy stupeň absorpce ovlivňuje délka expozice, lipofilita činidla a přítomnost rozpouštědel, například xylenu. Rychlost absorpce se také liší podle postižené oblasti kůže. Například, OPP Parathion se snadněji absorbuje přes kůži v podpaží, hlavy a krku, než přes kůži rukou a paží. [12, 13]

Po vstřebání se OPP hromadí v tuku, játrech, ledvinách a ve slinných žlázách. Fosfothioáty, mezi jejichž zástupce patří diazinon, parathion, či bromofos, jsou více lipofilní než fosfáty, například dichlorvos. Oxidační desulfurací pomocí cytochromu P450 se fosfothioáty biotransformují na aktivní fosfátovou formu, proto se příznaky intoxikace fosfothioátovými pesticidy objevují se zpožděním (většinou do 12 hodin od expozice). [12, 13]

Jeden ze zástupců OPP je diazinon (Obrázek 9). Jedná se o bezbarvou až tmavě hnědou kapalinu, která se využívá pro zemědělské, komerční i domácí účely. Používá se i jako veterinární přípravek proti blechám a klíšťatům. Akutní otrava tímto insekticidem způsobuje inhibici enzymu AChE. Avšak vzhledem k nízké selektivitě diazinonu vůči hmyzímu enzymu, výrazné toxické účinky se projevují i u savců, včetně člověka. Pro potkany, kteří byli vystaveni diazinonu technické kvality je LD₅₀ od 300 do 400 mg/kg. Diazinon v živých organismech je metabolizován na oxo-formu diazoxon (Obrázek 10), která je vůči AChE aktivnější v porovnání s parentním diazinonem. Ne všechny toxické účinky pramení z inhibice AChE, diazinon i diazoxon inhibují enzymy, které mají podobnou strukturu jako AChE, například enzym, který se účastní metabolismu aminokyseliny tryptofanu. [14, 15]



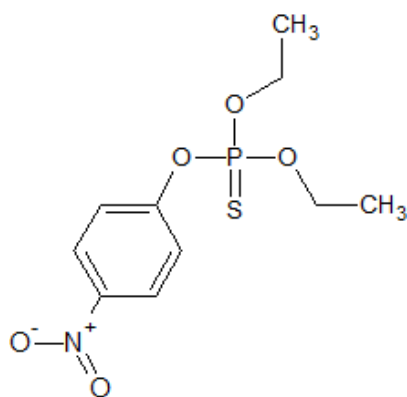
Obrázek 9: Diazinon



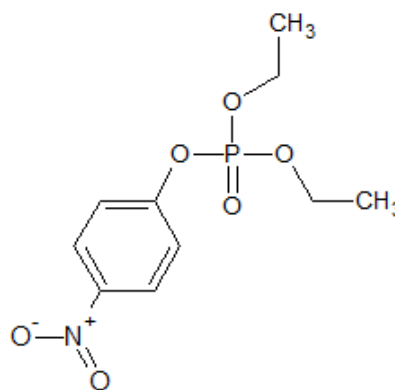
Obrázek 10: Diazoxon

Parathion (Obrázek 11), pokud se vyskytuje v čisté formě, je bílá krystalická látka. Většinou se však s touto látkou setkáváme ve formě hnědé kapaliny, která zapáchá po hnilých vejcích, nebo česneku. Parathion, který byl vstřebán do organismu, se metabolizuje na paraoxon

(Obrázek 12), což je aktivní forma, která inhibuje AChE. Hodnota LD₅₀, stanovená na laboratorních potkanech se pohybuje mezi 2 až 30 mg/kg. Kvůli své vysoké toxicitě byl parathion zakázán v mnoha státech Evropské Unie (EU), Švýcarsku, Peru i Chile. Pro člověka je hodnota LD₅₀ od 5 do 10 mg/kg. [16] Parathion je vysoce toxický při všech cestách expozice. [17]

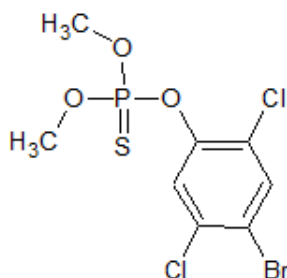


Obrázek 11: Parathion



Obrázek 12: Paraoxon

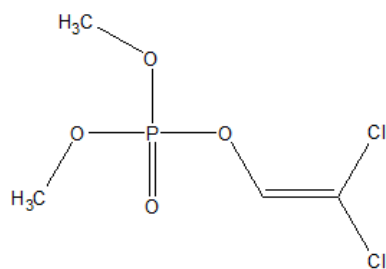
Bromofos (Obrázek 13) se vyskytuje ve formě žlutých krystalů. V EU není povoleno používání pesticidů s touto účinnou látkou. [18] Bromofos není registrován pro použití ani v USA. [19] Hodnota LD₅₀ pro potkany je 1,6 mg/kg. [3]



Obrázek 13: Bromofos

Dichlorvos (Obrázek 14), pro jehož označení se běžně používá i zkratka DDVP, je OPP vyskytující se ve formě bezbarvé až jantarové kapaliny. [20, 21] Používá se k hubení hmyzu v domácnostech, restauracích, divadlech i v hospodářských budovách. [22] Dichlorvos patří mezi skupinu insekticidů, které je možné absorbovat na suchý nosič. [23] DDVP se používá k výrobě antiparazitních obojků pro domácí mazlíčky. [24] Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer, IARC) zařadila DDVP do skupiny 2B, což je skupina látek, které jsou potenciálními karcinogeny pro člověka. [20] Ve srovnání s jinými OPP, DDVP způsobuje rychlejší nástup symptomů, ale i rekonvalescenci, protože je rychle metabolizován a vylučován z těla. Hodnota LD₅₀ u potkanů se pohybuje v rozmezí 70,4

až 250 mg/kg. Toxicitu DDVP zvyšují i faktory vnějšího prostředí jako jsou vysoké teploty prostředí, vystavení DDVP světlu, či požití alkoholických nápojů. [24]



Obrázek 14: Dichlorvos

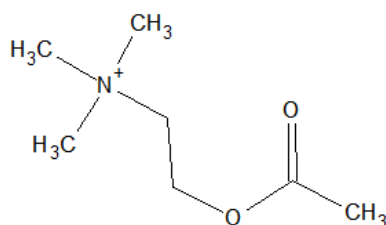
1.2 Mechanismus účinku organofosforových sloučenin

1.2.1 Cholinergní neurotransmise

Cholinergní neurotransmise je přenesení vzruchu z jednoho neuronu na další neuron, žlázu či svalovou buňku pomocí neurotransmiteru ACh. K tomuto přenosu vzruchu dochází na nervosvalové ploténce, v centrálním nervovém systému (CNS) i v autonomním nervovém systému (ANS). Synaptický chemický přenos má tři hlavní části: presynaptické zakončení axonu, synaptickou štěrbinu a postsynaptický neuron. Vzruch, který je přenášen po axonu stimuluje synaptická vezikula, která uvolní, v případě cholinergní neurotransmise, ACh do synaptické štěrbiny. ACh se po uvolnění do synaptické štěrbiny váže na své receptory na postsynaptickém neuronu. K terminaci účinku ACh dochází v synaptické štěrbině v důsledku působení enzymu AChE, který rozkládá ACh na acetát a cholin. [25]

1.2.2 Acetylcholin

Acetylcholin (Obrázek 15) je excitační neurotransmiter, který působí v CNS a ANS na všech pregangliových i parasympatických postgangliových zakončení a v některých sympatických postgangliových nervových zakončení. [25, 26] Z chemického hlediska je ACh ester kyseliny octové a cholinu. [3] K jeho syntéze dochází v cytoplazmě nervových zakončení, kde je acetylová skupina acetylkoenzymu A přenesena na cholin za pomoci enzymu cholinacetyltransferasy. [25] Syntetizovaný ACh se hromadí ve vezikulech, které v případě šíření akčního potenciálu, exocytózou uvolní ACh do synaptické štěrbiny.[27]



Obrázek 15: Acetylcholin

1.2.3 Cholinergní receptory

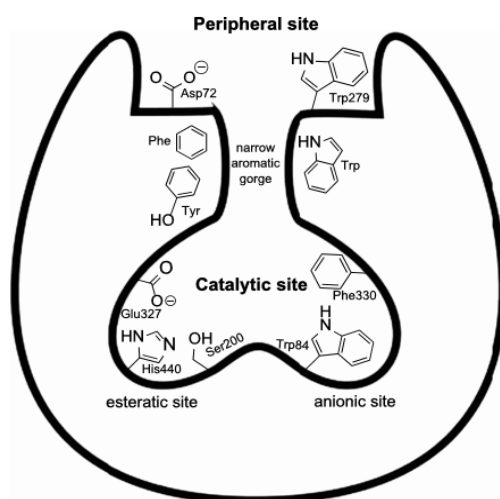
ACh se váže na své cholinergní receptory. Jsou známy dva druhy cholinergních receptorů, nikotinové a muskarinové receptory. Nikotinové receptory jsou složeny z 5 podjednotek a obsahují dvě vazebná místa pro ACh. Jedná se o velice rychle reagující receptory. V případě navázání ACh na receptor, dojde k otevření kanálů pro Na^+ , Ca^{2+} a K^+ . Ionty Na^+ a Ca^{2+} pak pronikají do buňky, K^+ naopak proniká směrem ven z buňky. Dochází tak k depolarizaci postsynaptické membrány a ke zvýšení záporného potenciálu. [25, 27] Nervový typ nikotinového receptoru se nachází ve vegetativních gangliích, zatímco svalový typ na

nervosvalové ploténce. Svalový typ daného receptoru se skládá z jiných podjednotek než typ nervový. [25]

Muskarinové receptory se nachází v centrální i periferní nervové soustavě. Tyto receptory jsou tvořeny bílkovinným řetězcem. Muskarinové receptory jsou spřaženy s G-proteinem a vytváří tak druhého posla, což vede ke změně koncentrace Ca^{2+} . [27] O tomto druhu receptorů je známo, že má dlouhou dobu latence. Rozlišujeme 5 druhů muskarinových receptorů M_1 - M_5 . [28] Nachází se v různých oblastech a jsou spřaženy s různými druhy G-proteinů. Například, muskarinový receptor M_1 je spřažen s G_q -proteinem a nachází se ve vegetativních gangliích, CNS a v buňkách exokrinních žláz, zatímco muskarinový receptor M_2 je spojen s G_i -proteinem a vyskytuje se v srdci. [25]

1.2.4 Acetylcholinesterasa

Cyklus ACh je ukončen hydrolýzou, která je zprostředkována enzymem acetylcholinesterasou (Obrázek 16). AChE je protein, na jehož povrchu se nalézá periferní anionické místo, které ústí v aromatickou štěrbinu. Na dně aromatické štěrby se nachází katalyticky aktivní místo, které se skládá ze dvou podjednotek: anionické a esteratické. Úkolem anionické podjednotky je správná orientace molekuly ACh. Esteratická podjednotka se skládá z tzv. katalytické triády, kterou u člověka tvoří serin 200, histidin 440 a kyselina glutamová 327. [29] K vlastní hydrolýze ACh dochází po navázání ACh na serinový zbytek, kde dochází ke štěpení ACh na acetylový zbytek a cholin. Až 50 % cholinu je zpětně vstřebáno do presynaptického neuronu a je opět použito pro tvorbu ACh. [25, 27]



Obrázek 16: Acetylcholinesterasa [30]

1.2.5 Inhibice acetylcholinesterasy

Inhibice AChE může být reverzibilní, pseudoreverzibilní, nebo ireverzibilní. Reverzibilní inhibitory mají krátké trvání účinku. Vazba inhibitoru a enzymu je slabá. Své využití našly reverzibilní inhibitory při léčbě neurodegenerativních poruch. Příkladem reverzibilního inhibitoru, který se používá při léčbě Alzheimerovy choroby, je donepezil. [31] Pseudoreverzibilní inhibitory, například karbamáty, se v aktivním místě AChE navážou kovalentní vazbou na serinový hydroxyl. Tento typ inhibice lze, avšak obtížně, hydrolyzovat. [3, 32] Ireverzibilní inhibitory se váží na serinový hydroxyl AChE za vzniku esteru, který je možné pomocí reaktivátorů AChE hydrolyzovat a obnovit tak funkci AChE. Po procesu zvaném stárnutí, nebo také spontánní dealkylace, komplex enzymu s inhibitorem už nelze hydrolyzovat ani pomocí reaktivátorů. V rámci stárnutí dochází k dealkylaci na esterové funkční skupině, která vznikla na fosforylovaném serinu. Po tomto procesu na receptoru tak zůstává navázaný fosfonátový anion, který již nelze hydrolyzovat. Do skupiny ireverzibilních inhibitorů patří OPP a nervově paralytické látky. [3, 32]

1.3 Klinické příznaky intoxikace

Ve většině případů, první symptomy intoxikace OP se začínají objevovat až když aktivita AChE klesne pod 70 % normální hodnoty. Pokud aktivita AChE klesne pod 20 %, jedná se o těžkou otravu. Při život ohrožujících intoxikacích je aktivita AChE neměřitelná. [33]

1.3.1 Cholinergní krize

V případě navázání OP na AChE nedochází k hydrolýze acetylcholinu, což má za následek nahromadění ACh v synaptické štěrbině a nadměrnou stimulaci muskarinových a nikotinových receptorů. Proto u pacientů intoxikovaných OP můžeme očekávat příznaky, které budou způsobeny právě nadměrnou stimulací výše-zmíněných receptorů. Vedle těchto příznaků se u postižených mohou vyskytnout i symptomy centrální. Nikotinové, muskarinové a centrální symptomy charakterizují akutní cholinergní krizi. [1]

1.3.2 Nikotinové příznaky

Mezi nikotinové příznaky patří svalová ochablost, třes, záškuby a křeče. Dochází k poruše nervosvalového přenosu. V případě těžkých otrav může dojít až k paralýze kosterního a dýchacího svalstva, včetně bránice. [34]

1.3.3 Muskarinové příznaky

Nadměrná stimulace muskarinových receptorů ovlivňuje chod dýchací, trávicí, vylučovací a kardiovaskulární soustavy, dále pak také funkci exokrinních žláz a očí. Jmenovitě se jedná o symptomy, jako jsou dušnost, zvýšená sekrece bronchiálních žlázek, kašel, cyanóza, plicní edém. V gastrointestinálním traktu dochází k průjmům, nevolnostem, zvracení a bolestem břicha. Kardiovaskulární příznaky intoxikace jsou bradykardie a pokles krevního tlaku. Dalšími příznaky jsou mióza, rozmazané vidění, slzení, slinění a zvýšené pocení. [33, 34]

1.3.4 Centrální příznaky

U postižených se vyskytují bolesti hlavy, zmatenost, dezorientace, úzkost, neklid, či neschopnost soustředit se. [1]

1.3.5 Příčina úmrtí

Pacient většinou umírá na respirační selhání, bez léčby, do 24 hodin. Respirační selhání je zapříčiněné depresí dechového a kardiovaskulárního centra v prodloužené míše, paralýzou dýchacích svalů, zvýšenou sekrecí bronchů a otokem plic. Další příčinou smrti bývá srdeční arytmie, která se může objevit i po několika hodinách od otravy. [33]

1.3.6 Prognóza

Mimo akutní příznaky intoxikace OP se u postiženého mohou vyskytnout i organofosfáty indukované opožděné neuropatie (OPIDN). OPIDN se projevují od jednoho do tří týdnů po intoxikaci. Prvními příznaky jsou křečovitě bolesti, deprese šlacho-svalových reflexů, necitlivost, mravenčení v dolních, někdy i v horních končetinách. Prognóza postiženého závisí na závažnosti neurologického poškození. Přibližně po roce může dojít ke zlepšení, ale u vážných případů příznaky přetrvávají. [34]

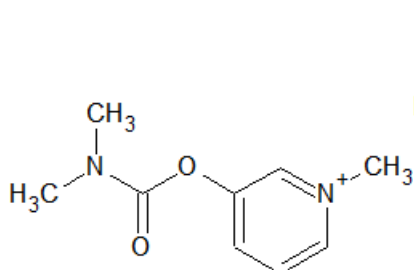
Po překonání akutní otravy OP u postižených přetrvávají neurologické i neuropsychické příznaky měsíce až roky. Postižení mají problémy se spánkem, únavou, pamětí, sníženou koncentrací, výjimkou nejsou ani depresivní stavy či emoční labilita. [1]

1.4 Profylaxe intoxikace organofosforovými sloučeninami

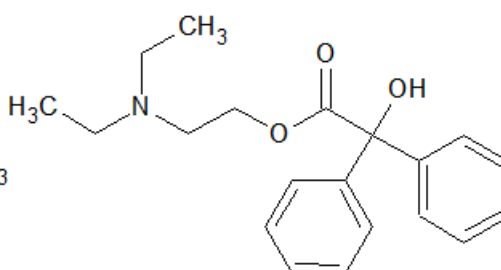
Podle způsobu ochrany, kterou poskytuje před intoxikací OP, profylaxi rozdělujeme na mechanickou a farmakologickou,

Mechanickou profylaxí je možné se chránit pomocí ochranné masky a ochranných oděvů. Je potřeba myslet na to, že OP se snadno absorbují kůží i dýchacími cestami, proto je důležité dbát na utěsnění, správné zapojení a funkci daných ochranných pomůcek. [35]

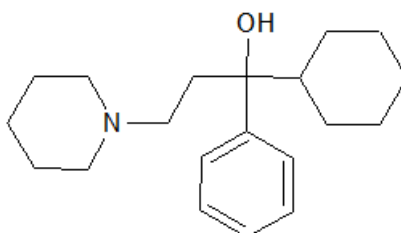
Farmakologická profylaxe zahrnuje dva možné přístupy, buď podání reverzibilních inhibitorů AChE nebo zahájení léčby v předstihu. [1, 6] Reverzibilní inhibitory AChE přechodně obsazují aktivní místo AChE, čímž brání navázání ireverzibilních inhibitorů do stejného místa enzymu. Nejčastěji používaným zástupcem dané skupiny je pyridostigmin (Obrázek 17). [3] Velkým nedostatkem daného léčiva je však jeho kvarterní náboj, který brání průniku této látky do centrálních kompartmentů. Z daného důvodu Armáda České republiky zavedla kombinaci zvanou PANPAL. PANPAL je směs pyridostigminu, benaktyzinu (Obrázek 18) a trihexyfenidylu (Obrázek 19). Benaktyzin a trihexyfenidyl snižují nežádoucí účinky pyridostigminu a zmírňují symptomy, které vznikají nahromaděním ACh v centrální nervové soustavě. [1, 6] Další možnou farmakologickou profylaxí je použití antidota TRANSANT, což je náplast pro perkutánní aplikaci, která se aplikuje v předstihu před intoxikací. Přípravek obsahuje reaktivátor AChE HI-6. [36]



Obrázek 17: Pyridostigmin



Obrázek 18: Benaktyzin



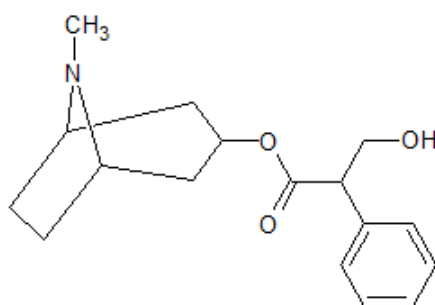
Obrázek 19: Trihexyfenidyl

1.5 Léčba otrav organofosforovými sloučeninami

Léčbu otrav OP je možné rozdělit na symptomatickou a kauzální. Symptomatická léčba se vyznačuje tlumením příznaků (symptomů), které vznikly v důsledku otravy, ale neřeší hlavní příčinu intoxikace. Pro symptomatickou léčbu se využívají parasymptolytika a antikonvulziva. Ke kauzální léčbě, která odstraňuje příčinu onemocnění, se využívají oximové reaktivátory AChE. [1, 37] Reaktivátory AChE jsou přítomny i v tříkomorovém autoinjektoru MULTIPEN HAD, která obsahuje ve svých třech komorách sůl HI-6 dimethansulfonátu v pevné formě, roztok atropinu a ve třetí komoře roztok diazepam. [38]

1.5.1 Parasymptolytika

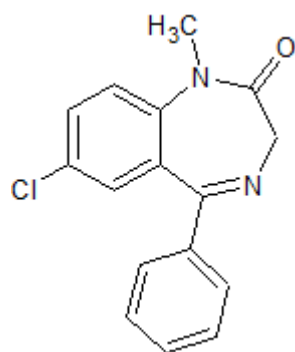
Parasymptolytika antagonizují účinek ACh na muskarinových receptorech. Na nikotinové receptory nemají parasymptolytika téměř žádný vliv. [1] Nejčastěji užívaným zástupcem je atropin (Obrázek 20). V prvních dvou až třech hodinách po intoxikaci se podávají vysoké dávky atropinu až do příznaků tzv. atropinizace. [39] Mezi příznaky atropinizace patří zčervenání, suchá kůže, mydriáza a tachykardie. [40]



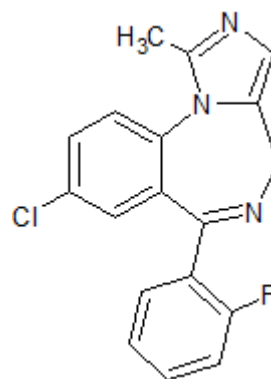
Obrázek 20: Atropin

1.5.2 Antikonvulziva

K tlumení vzniklých křečí se postiženému podávají tzv. antikonvulziva. Jako nejvíce účinná skupina antikonvulziv v terapii otrav OP se ukázaly benzodiazepiny, konkrétně diazepam (Obrázek 21) a midazolam (Obrázek 22). Pro standardní léčebnou terapii je doporučován a používán diazepam. [1]



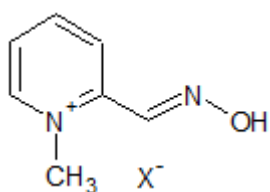
Obrázek 21: Diazepam



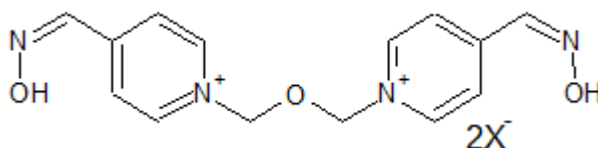
Obrázek 22: Midazolam

1.5.3 Reaktivátory acetylcholinesterasy

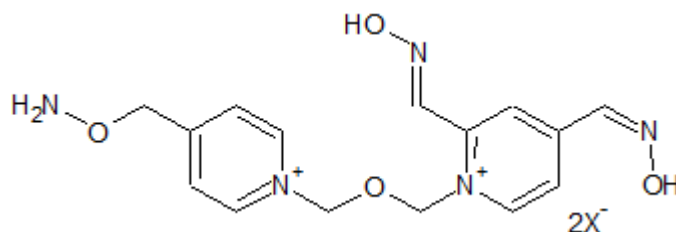
V současné době se v praxi při otravě OP používá zejména těchto 5 oximových reaktivátorů acetylcholinesterasy: 4-Pyridinaldoxid (Obrázek 23), obidoxim (Obrázek 24), HI-6 (Obrázek 25) a trimedoxim (Obrázek 26). [41]



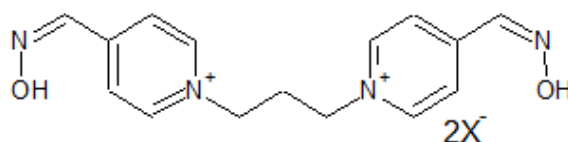
Obrázek 23: 4-Pyridinaldoxid



Obrázek 24: Obidoxim



Obrázek 25: HI-6



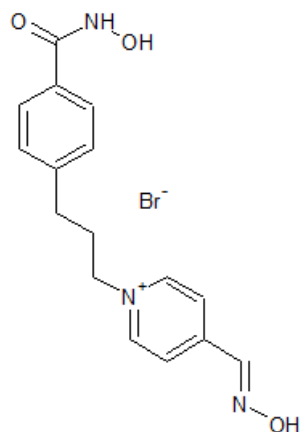
Obrázek 26: Trimedoxim

Reaktivátory AChE jsou vzhledem ke své vysoké nukleofilitě schopny vyvázat fosforylovanou skupinu z katalytického serinu a tím obnovit funkci AChE. Reaktivace začíná útokem disociovaným oximovým reaktivátorem, který napadá atom fosforu inhibované AChE. Následně dochází ke tvorbě fosforylovaného oximu a reaktivaci AChE. [41, 42] Úspěšnost

reaktivace ovlivňuje nejen chemická struktura a nukleofilita reaktivátoru, ale i doba podání. Hlavně zda byl reaktivátor podán před, nebo po procesu „stárnutí“, tj. po dealkylaci, kdy již není možné enzym reaktivovat. [1, 30] S ohledem na chemickou strukturu reaktivátorů AChE, problematickou částí je jejich kladný náboj, který zabraňuje prostupu reaktivátoru AChE přes hematoencefalickou bariéru. [41] Dalším nedostatkem reaktivátorů je úzká škála účinnosti. V dnešní době není známý žádný univerzální reaktivátor AChE, který by byl stejně účinný proti všem OP. Například léčiva pralidoxim a obidoxim jsou dostatečně účinné pro reaktivaci enzymu, který byl inhibován látkou VX či sarinem, ale nejsou účinné proti inhibici AChE způsobené somanem, nebo cyklosarinem. Důvodem je kratší doba stárnutí u enzymu inhibovaném somanem, ke které dochází během několika minut, na rozdíl od VX a sarinu. [1] Zmíněný nedostatek vedl k designu a syntéze dalších reaktivátorů AChE. Dobré výsledky byly zaznamenány u reaktivátorů HI-6 (Obrázek 25) a trimedoximu (Obrázek 26). [43] Oproti obidoximu má HI-6 o mnoho méně nežádoucích účinků. Ale nevýhodou látky HI-6 je její nestálost ve vodných roztocích. [44]

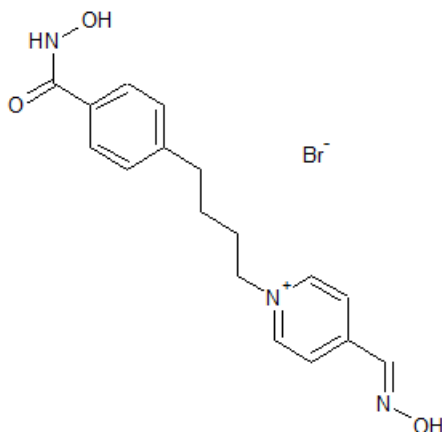
2 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce byla syntéza monokvarterních oxim-hydroxamátových reaktivátorů. Syntetický postup vedoucí k prvnímu finálnímu produktu se skládal ze 7 reakčních kroků, jejichž výsledkem byla sloučenina 1-{3-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]propyl}-4-[(*E*)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromidu (**7**) (Obrázek 28).



Obrázek 28: 1-{3-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]propyl}-4-[(*E*)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromid

Dalším cílem této bakalářské práce byla syntéza druhého finálního produktu 1-{4-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]butyl}-4-[(*E*)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromidu (**10**) (Obrázek 29). Jednalo se o syntézu, která se skládala ze 3 reakčních kroků.



Obrázek 29: 1-{4-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]butyl}-4-[(*E*)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromid

3 Experimentální část

Všechny chemikálie i rozpouštědla byly dodány firmami Sigma-Aldrich a VWR International (Česká republika). Chemikálie i rozpouštědla byly dodány v potřebné čistotě pro syntézu. Pro kontrolu reakcí byla použita tenkovrstvá chromatografie (TLC). Byly použity hliníkové desky potažené silikagelem či celulózou, konkrétně: TLC desky Merck silica gel 60 F₂₅₄, nebo Cellulose F, dodávány firmou Merck (Německo). Pro detekci byla použita UV lampa s nastavenou vlnovou délkou 254 nm. Teplota tání byla stanovena na bodotávku Büchi B-545 (Německo) bez korekce. Sloučeniny byly připravené o požadované čistotě. Hmotnostní spektrometrie byla měřena pomocí spektrometru Agilent 6470 (QQQ) (Santa Clara, USA). Spektra ¹H NMR (při frekvenci 500MHz) a ¹³C NMR (při frekvenci 126 MHz) byla změřena na spektrometru Varian S500 (Varian Comp, Palo Alto, USA). Chemické posuny δ , udávané v jednotkách ppm, jsou vztaženy k používání deutériového rozpouštědla.

3.1 Design

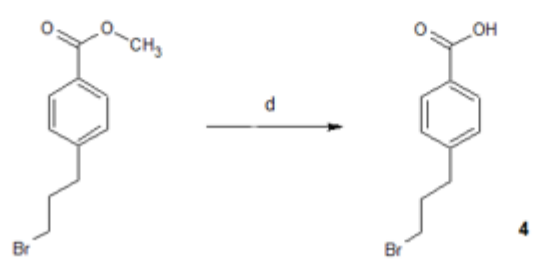
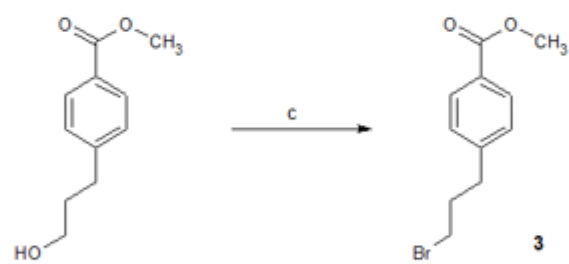
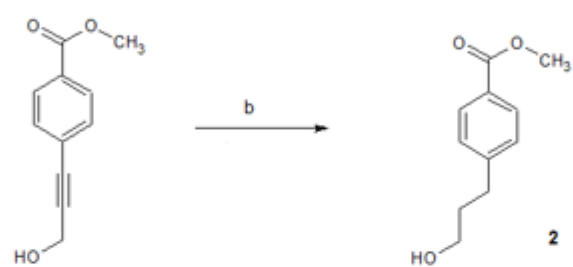
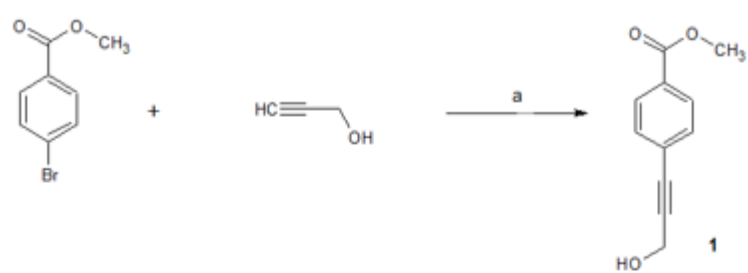
Mezi strukturní faktory, které ovlivňují afinitu reaktivátorů AChE k inhibované AChE patří přítomnost kvartérního dusíku, délka a rigidita spojovacího řetězce mezi dvěma pyridiniovými kruhy, přítomnost oximové skupiny, či poloha oximové skupiny na pyridinovém kruhu. [45]

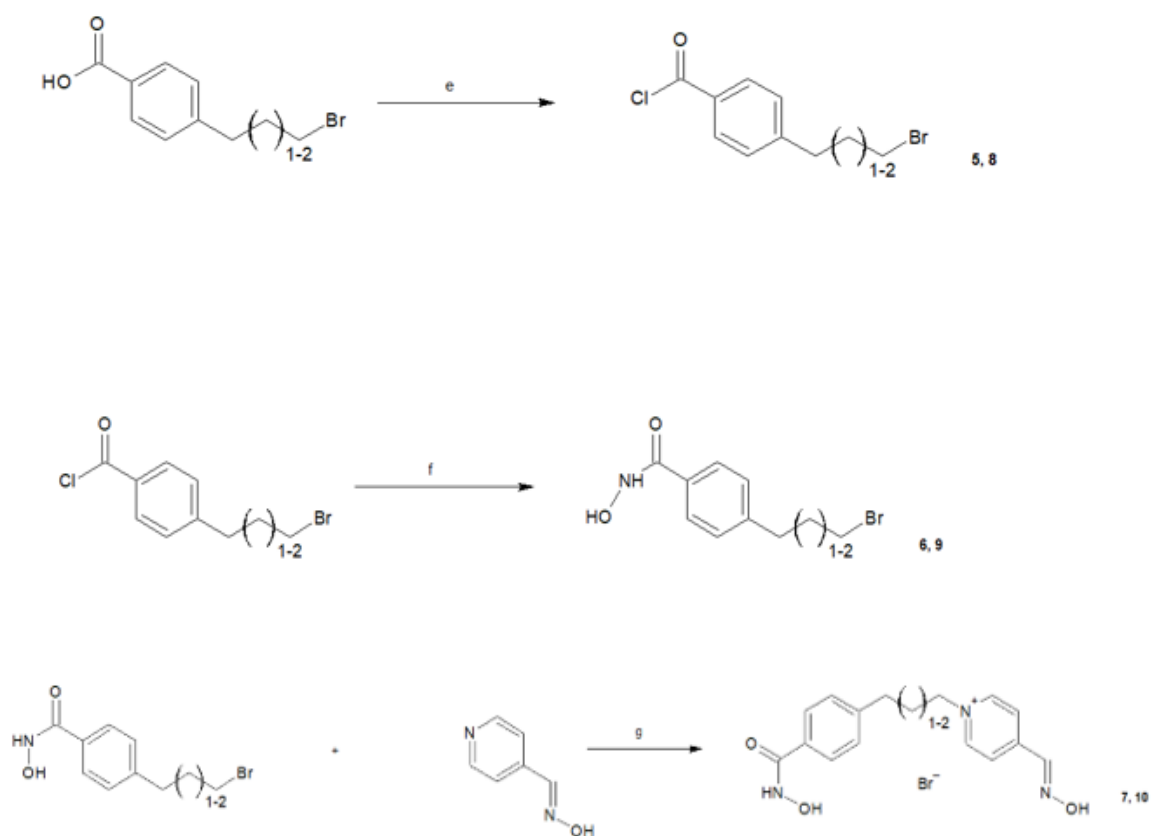
Přítomnost kvartérního dusíku v molekule reaktivátoru umožňuje vstup reaktivátoru na dno aromatické štěrbiny, kde se nachází katalyticky aktivní místo. Biskvartérní reaktivátory mají obecně vyšší afinitu k inhibované AChE, než reaktivátory monokvartérní. [45]

Je známá závislost, pro n-methylované vazby, mezi délkou spojovacího řetězce a OP, které inhibují AChE. Pro tabun, sarin, či VX, které inhibují AChE, je vhodný reaktivátor, který má tři nebo čtyř uhlíkatý spojovací řetězec. Ale pro AChE inhibovanou cyklosarinem je nejúčinnější reaktivátor, který má pouze jednouhlíkatý spojovací řetězec, což je například methoxim. [45, 46] Pro spojovací řetězec je výhodnější, aby se ve spojovacím řetězci vyskytovaly vazby jednoduché, protože dvojné vazby snižují účinnost reaktivátorů. [45]

Společným strukturním znakem reaktivátorů AChE je přítomnost oximové skupiny ($-\text{CH}=\text{NOH}$), protože je dost účinná, aby přerušila vazbu mezi inhibitorem a AChE. Oxim o vhodném pKa se v lidském těle částečně disociuje na oximátový anion ($-\text{CH}=\text{NO}^-$). Oximátový anion pak atakuje kovalentní vazbu mezi hydroxylovou skupinou serinu AChE a organofosforovým inhibitorem. Výsledkem je AChE s obnovenou katalytickou funkcí a fosforylovaný oxim. [1, 47] Po intoxikaci OPP jsou nejúčinnější reaktivátory, které mají oximovou skupinu v pozici čtyři, ale obecně jsou reaktivátory s oximovou skupinou na pozici dva a čtyři více účinné, než kdyby byla oximová skupina v pozici tři. [45]

Pro design (Obrázek 30) námi navržených sloučenin jsme vycházely z výše uvedených zákonitostí. Co se týče přítomnosti kvartérního dusíku, tak jsme zvolily monokvartérní variantu, která má dostatečnou afinitu ke katalyticky aktivnímu místu enzymu a zároveň nevykazuje tak vysokou polaritu, jako je tomu u biskvartérních analogů. Dle dostupných informací jako nejvhodnější délka spojovacího řetězce se jevíly ta se třemi a čtyřmi uhlíky. Nakonec, důvod volby hydroxamátové skupiny byl takový, že sama o sobě je rovněž schopna reaktivace, i když v menší míře než je tomu u oximové skupiny. [48]



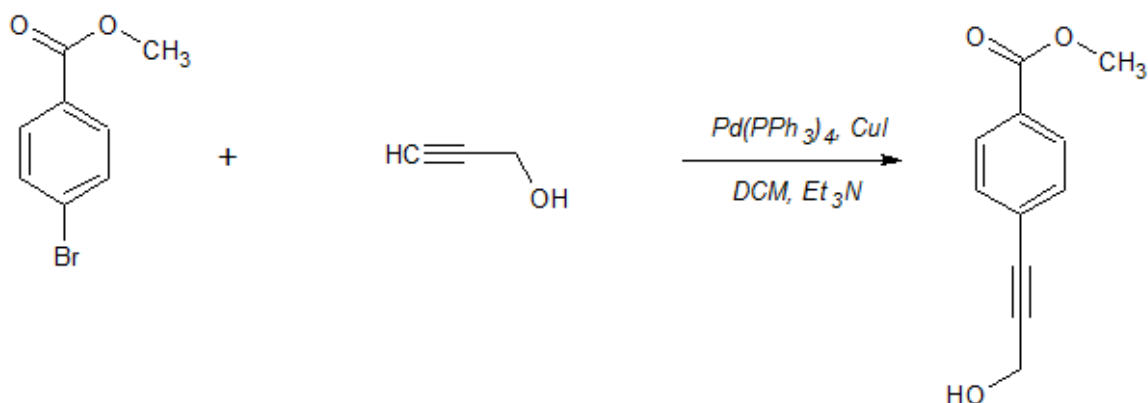


Podmínky: a) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI , DCM, Et_3N ; b) 5% Pd/C , MeOH , EA; c) Ph_3P , CBr_4 , DCM; d) NaOH , acetone, H_2O ; e) SOCl_2 , toluen; f) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOH , ether; g) acetone.

Obrázek 30: Syntetické schéma

3.2 Syntéza jednotlivých sloučenin

3.2.1 Příprava methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoátu (1)



Vzhled: Hnědá pevná látka

Molární hmotnost: 190,2 g/mol

Tt: 80,3 – 83,0°C

Výtěžek: 62 %

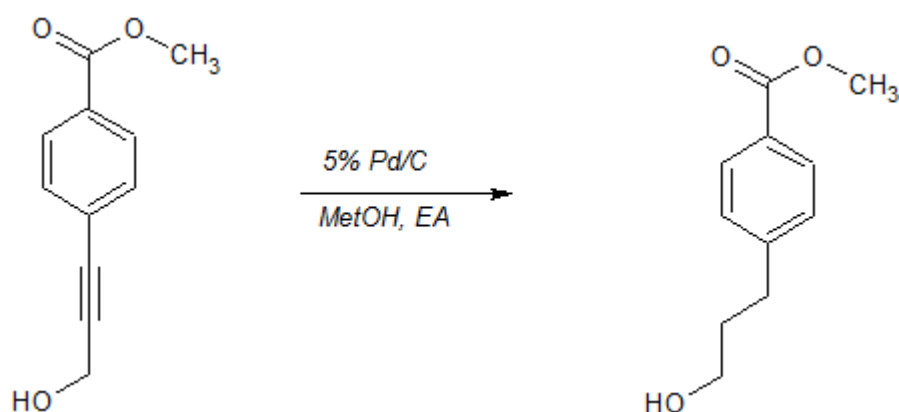
Postup: Výchozí látka methyl 4-bromobenzoát (5 g, 23 mmol) byla smíchána s DCM (240 ml) a Et₃N (125 ml) pod N₂ atmosférou. Po 5 minutách byl přidán prop-2-yn-1-ol (1,35 ml, 23 mmol). Roztok se nechal po dobu 30 minut probublávat plynným dusíkem. Následně byl přidán do roztoku CuI (0,41 g, 2,32 mmol) a Pd(PPh₃)₄ (1,34 g, 1,16 mmol). Roztok byl míchán přes noc při laboratorní teplotě. Čištění produktu probíhalo pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází (MF) petrolether (PE) a ethylacetát (EA) v poměru 3:1. Po odstranění vedlejších produktů byl zvolen gradient na poměr 2:1. Odpaření přebytečného rozpouštědla poskytlo kýžený meziprodukt.

m/s (ESI⁺): *m/z* [M+H]⁺ 191,1; nalezeno 191,0

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-*d*): δ 7.97 – 7.86 (m, 2H), 7.45 – 7.37 (m, 2H), 4.49 (s, 2H), 3.88 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃-*d*): δ 166.68, 131.53, 129.52, 129.43, 127.40, 90.62, 84.54, 52.30, 51.28.

3.2.2 Příprava methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoátu (2)



Vzhled: hnědá kapalina

Molární hmotnost: 194,2 g/mol

Výtěžek: 63 %

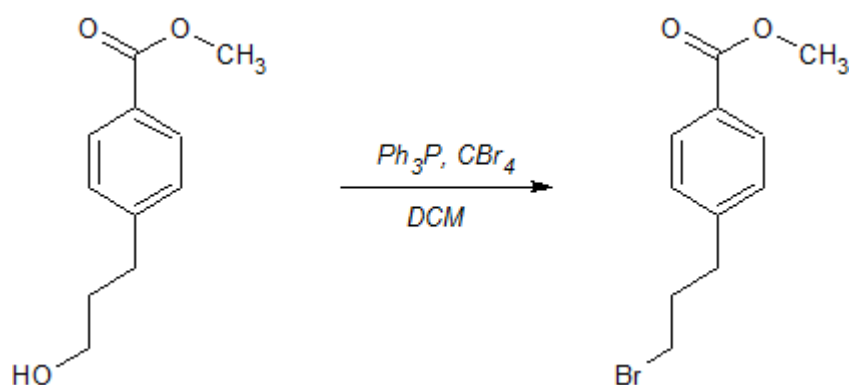
Postup: Výchozí látka methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoát (2,72 g, 14,3 mmol) byla vystavena N₂ atmosféře po dobu 5 minut, než byl přidán suchý MetOH (600 ml) a suchý EA (300 ml). Po 10 minutách od přidání rozpouštědel byl přidán 5% Pd/C (4,00 g, 1,9 mmol). Roztok byl po 10 minutách vystaven vakuu, aby následně mohl být do baňky s reakční směsí zaveden vodík. Reakční směs se nechala redukovat v H₂ atmosféře přes noc při laboratorní teplotě. Následně byl roztok zfiltrován přes celit a filtrát zakoncentrován odpařením rozpouštědla na vakuové odparce. Produkt byl čištěn prostřednictvím sloupcové chromatografie s MF o složení PE:EA v poměru 5:1, následně v poměru 1:1.

m/s (ESI⁺): *m/z* [M+H]⁺ 195,1; nalezeno 195,1

¹H NMR (500 MHz, CH₃OD-*d*₄): δ 7.95 – 7.89 (m, 2H), 7.36 – 7.27 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.57 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.79 – 2.71 (m, 2H), 1.89 – 1.81 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, CH₃OD-*d*₄): δ 168.59, 149.42, 130.64, 129.65, 128.91, 62.05, 52.46, 35.04, 33.08.

3.2.3 Příprava methyl 4-(3-bromopropyl)benzoátu (3)



Vzhled: bezbarvá kapalina

Molární hmotnost: 257,1 g/mol

Výtěžek: 83 %

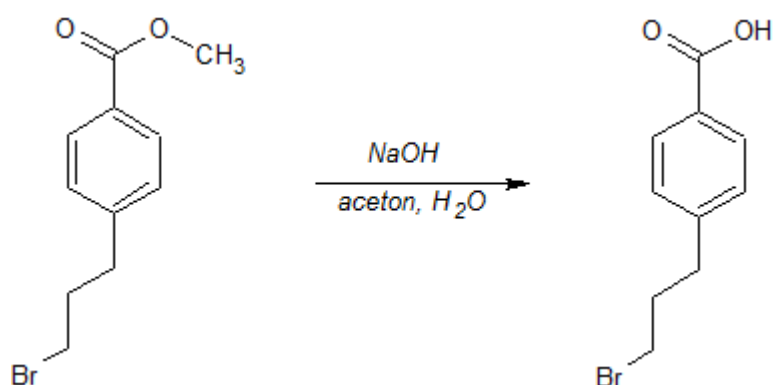
Postup: Byly připraveny dvě baňky. Baňka A obsahovala methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoát (1,74 g, 8,98 mmol) a suchého DCM (33 ml) v N_2 atmosférou. V baňce B byl připraven roztok z CBr_4 (3,87 g, 11,67 mmol) a suchého DCM (34 ml). Do baňky A byl přidán Ph_3P (3,30 g, 12,57 mmol). Po 5 minutách byl do baňky A přidán obsah baňky B. Roztok se nechal hodinu míchat za pokojové teploty. Reakční směs zbavená nadbytečného rozpouštědla byla čištěna pomocí sloupcové chromatografie s MF o složení PE:EA v poměru 95:1.

m/s (ESI⁺): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 258,0; nalezeno 258,1

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 -d): δ 8.00 – 7.95 (m, 2H), 7.30 – 7.25 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.39 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.88 – 2.81 (m, 2H), 2.23 – 2.15 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3 -d): δ 166.96, 145.98, 129.81, 128.54, 128.19, 51.98, 33.93, 33.66, 32.68.

3.2.4 Příprava 4-(3-bromopropyl)benzoové kyseliny (4)



Vzhled: bílá pevná látka

Molární hmotnost: 243,1 g/mol

Tt: 115,5 – 118,7°C

Výtěžek: 82 %

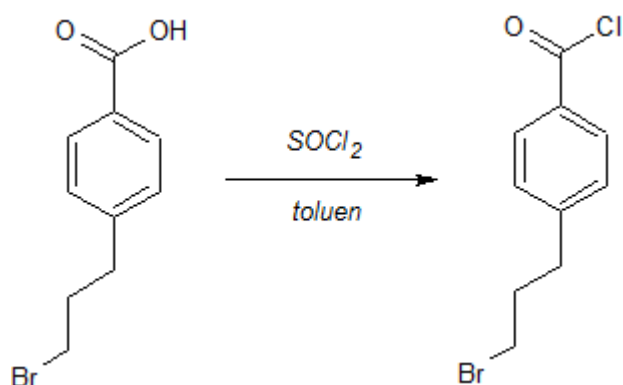
Postup: Methyl 4-(3-bromopropyl)benzoát (1,85 g, 6,72 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (14 ml), následně byl přidán roztok NaOH (0,46 g, 11,43 mmol, 6 ml). Roztok byl míchán přes noc při laboratorní teplotě. Z roztoku byl na vakuové odparce odpařen aceton a přidána H₂O (16 ml). Pomocí 6M HCl byl roztok okyselen na pH 1. Po okyselení byl roztok zfiltrován. Zfiltrovaná pevná látka se promývala vodou (7 ml), diethyletherem (2 ml) a opět vodou (3 ml). Při promývání produktu diethyletherem byla použita filtrace za atmosférického tlaku, jinak filtrace za sníženého tlaku z důvodu částečné rozpustnosti produktu v diethyletheru

m/s (ESI⁺): *m/z* [M+H]⁺ 244,0; nalezeno 243,9

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.80 (s, 1H), 7.89 – 7.84 (m, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.51 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.81 – 2.73 (m, 2H), 2.17 – 2.05 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): 167.42, 146.13, 129.69, 128.85, 128.78, 34.41, 33.64, 33.57.

3.2.5 Příprava 4-(3-bromopropyl)benzoyl chloridu (5)

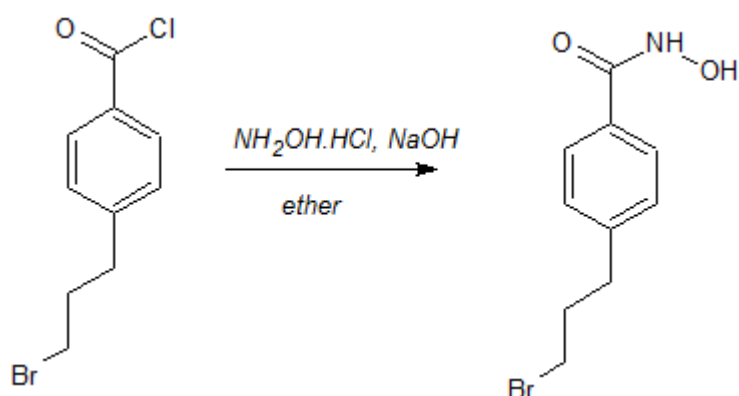


Vzhled: žlutý olej

Molární hmotnost: 261,5 g/mol

Postup: Pod N₂ atmosférou a při 74°C byla 4-(3-bromopropyl)benzoová kyselina (0,44 g, 1,81 mmol) rozpuštěna v toluenu (7,3 ml). Roztok se nechal probublat plynným dusíkem. Poté byl přidán SOCl₂ (0,26 ml, 3,62 mmol). Reakční směs reagovala 24 hodin při teplotě 74°C. Výsledný roztok byl zakoncentrován pomocí vakua a několikrát promyt čerstvým toluenem. Vzhledem k vysoké reaktivitě daného produktu byl ihned použit v dalším kroku.

3.2.6 Příprava 4-(3-bromopropyl)-*N*-hydroxybenzamidu (6)



Vzhled: hnědá pevná látka

Molární hmotnost: 258,1 g/mol

Tt: 109,2 – 111,2°C

Výtěžek: 73 %

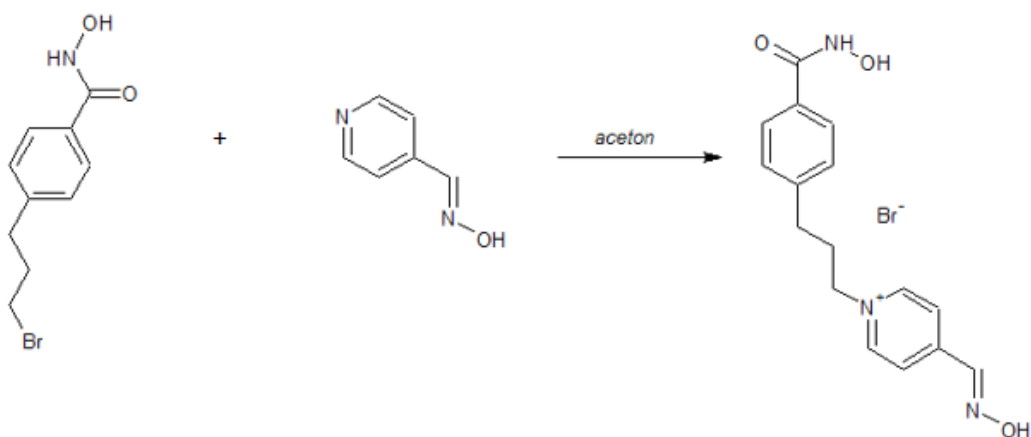
Postup: Nejdříve byl připraven 2M roztok NaOH (0,09 g, 2,35 mmol, 1,2 ml), který byl smíchán s $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (0,16 g, 2,35 mmol) v ledové lázni. Následně byla výchozí látka 4-(3-bromopropyl)benzoyl chlorid (0,47 g, 1,81 mmol) rozpuštěna v diethyletheru (7,3 ml). Roztok s výchozí látkou byl během 10 minut přikapáván do roztoku s $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$. Po dokapání roztoku reakční směs reagovala po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Roztok byl poté opět ochlazen na 0°C a do něj byla přidána 2M HCl (1 ml). Vzniklý produkt reakce byl zfiltrován.

m/s (ESI⁺): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 259,0; nalezeno 259,1

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.14 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 7.68 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 3.50 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.75 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.18 – 2.02 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.33, 144.14, 130.82, 128.54, 127.22, 34.45, 33.71, 33.42.

3.2.7 Příprava finálního produktu 1-{3-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]propyl}-4-[(E)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromidu (7)



Vzhled: hnědá pevná látka

Molární hmotnost: 380,2 g/mol

Tt: 151,3 – 153,6°C

Výtěžek: 73 %

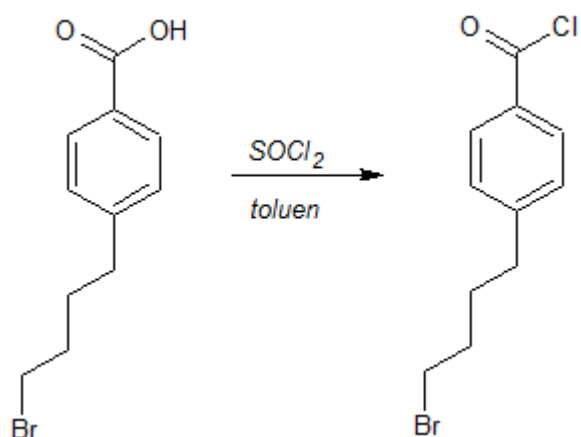
Postup: 4-(3-Bromopropyl)-*N*-hydroxybenzamid (0,19 g, 0,74 mmol) a 4-pyridinaldoxim (0,09 g, 0,72 mmol) byly smíchán v acetonu (6,7 ml). Po smíchání se roztok nechal reagovat za podmínek refluxu přes noc. Filtrace reakční směsi v acetonu poskytla pevný finální produkt.

m/s (ESI⁺): *m/z* [M+H]⁺ 381,1; nalezeno 381,0

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.82 (s, 1H), 11.13 (s, 1H), 9.03 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.96 (bs, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.22 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 4.59 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.65 – 1.52 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.31, 148.53, 145.30, 145.14, 145.07, 130.64, 128.46, 127.15, 124.28, 60.22, 34.36, 27.15.

3.2.8 Příprava 4-(4-bromobutyl)benzoyl chloridu (8)

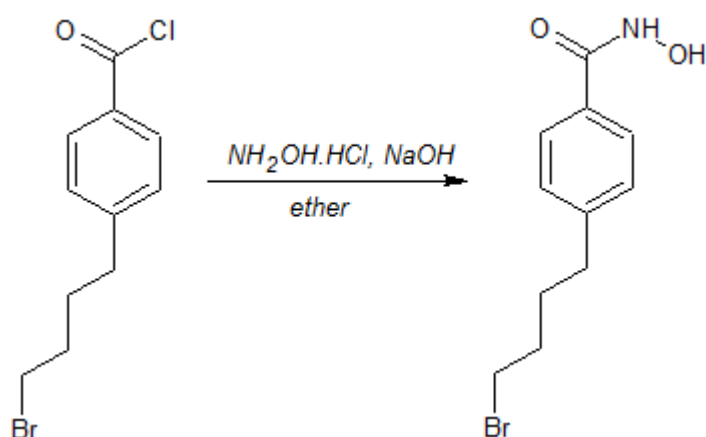


Vzhled: žlutý olej

Molární hmotnost: 275,6 g/mol

Postup: Pod N_2 atmosférou a při 74°C byla 4-(4-bromobutyl)benzoová kyselina (0,5 g, 1,94 mmol) rozpuštěna v toluenu (8,3 ml). Roztok se nechal probublat plynným dusíkem. Poté byl přidán SOCl_2 (0,28 ml, 3,9 mmol). Reakční směs reagovala 24 hodin při teplotě 74°C . Výsledný roztok byl zakoncentrován pomocí vakua a několikrát promyt čerstvým toluenem. Vzhledem k vysoké reaktivitě daného produktu byl ihned použit v dalším kroku.

3.2.9 Příprava 4-(4-bromobutyl)-*N*-hydroxybenzamidů (9)



Vzhled: hnědý olej

Molární hmotnost: 272, 14 g/mol

Výtěžek: 27 %

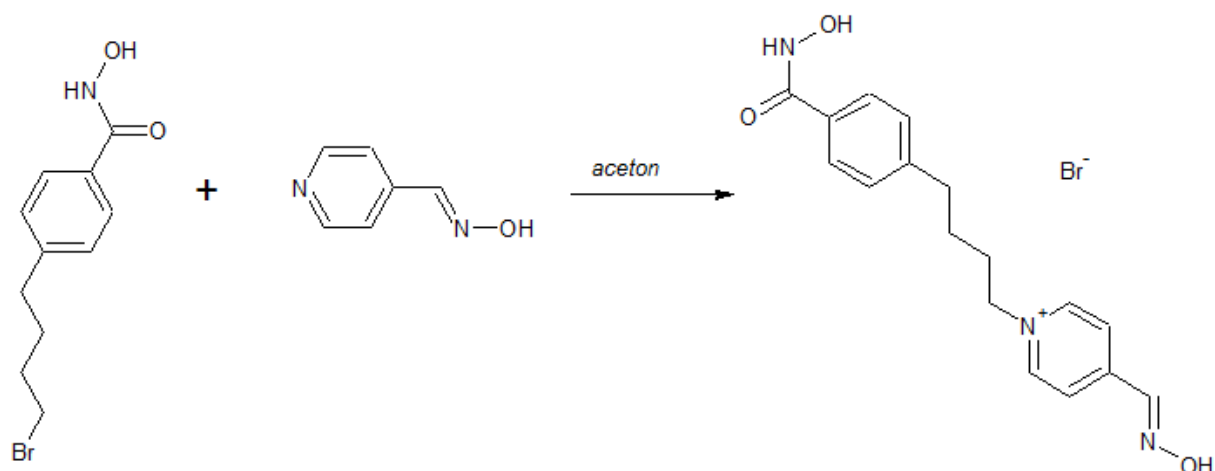
Postup: Nejdříve byl připraven 2M roztok NaOH (0,1 g, 2,52 mmol, 1,2 ml), který byl smíchán s $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (0,18 g, 2,52 mmol) v ledové lázni. Následně byla výchozí látka 4-(3-bromopropyl)benzoyl chlorid (0,53 g, 1,94 mmol) rozpuštěna v diethyletheru (8,2 ml). Roztok s výchozí látkou byl během 10 minut přikapáván do roztoku s $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$. Po dokapání roztoku reakční směs reagovala po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Roztok byl poté opět ochlazen na 0°C a do něj byla přidána 2M HCl (1,2 ml). Znečištěný produkt byl extrahován ve směsi ethylacetát x voda. Organická složka poté byla vysušena pomocí Na_2SO_4 a čištěna pomocí sloupcové chromatografie s MF o složení heptan:EA v poměru 1:1. Nakonec byl produkt zakoncentrován na vakuové odparce.

m/s (ESI⁺): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 273.0; nalezeno 273,0

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.13 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.54 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.64 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.87 – 1.75 (m, 2H), 1.74 – 1.62 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.41, 145.36, 130.59, 128.43, 127.13, 35.01, 34.06, 31.91, 29.29.

3.2.10 Příprava finálního produktu 1-{4-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]butyl}-4-[(E)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromidu (10)



Vzhled: hnědá pevná látka

Molární hmotnost: 394,3 g/mol

Tt: 175,4 – 177,1 °C

Výtěžek: 46 %

Postup: 4-(4-Bromobutyl)-*N*-hydroxybenzamid (0,14 g, 0,53 mmol) a 4-pyridinaldoxim (0,06 g, 0,53 mmol) byly smíchány v acetonu (5 ml). Po smíchání se roztok nechal reagovat za podmínek refluxu přes noc, při teplotě 56 °C. Následovalo odpaření rozpouštědla a opětovného přilítí acetonu. Roztok byl nakonec zfiltrován.

m/s (ESI⁺): *m/z* [M+H]⁺ 395,1; nalezeno 395,0

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.81 (s, 1H), 11.14 (s, 1H), 9.14 – 9.01 (m, 2H), 8.96 (bs, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.30 – 8.16 (m, 2H), 7.67 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.71 – 4.53 (m, 2H), 2.66 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.00 – 1.83 (m, 2H), 1.68 – 1.49 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.31, 148.52, 145.30, 145.15, 145.07, 130.62, 128.46, 127.15, 124.28, 60.21, 34.35, 30.41, 27.14.

4 Diskuze

K přípravě prvního produktu 1-{3-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]propyl}-4-[(E)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromidu (**10**) bylo zapotřebí 7 reakčních kroků.

Pro přípravu prvního meziproduktu methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoátu (**1**) byl využit princip Sonogashira couplingu. Reakce probíhala v inertní dusíkové atmosféře, aby se omezilo přístupu se vzdušnou vlhkostí. Nejdříve byla výchozí látka methyl 4-bromobenzoát rozpuštěna v dichloromethanu a smíchána s bází triethylaminem. Následovalo přidání katalyzátorů reakce CuI a Pd(PPh₃)₄. Reakční směs reagovala přes noc za laboratorní teploty. Meziprodukt byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie. Následně byl použit do další reakce, jako výchozí látka.

Následující reakční krok vedl k redukci trojné vazby. Dle původního syntetického plánu ve druhém kroku byla provedena Appelova reakce. Ale při následné redukci násobné vazby vznikala z větší části produkt eliminace HBr, což bylo důvodem, proč byl zvolen postup, kdy nejdříve byla redukována násobná vazba a následovala Appelova reakce.

Pro přípravu methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoátu (**2**) byla do baňky s výchozí látkou 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoátem (**1**) zavedena inertní dusíková atmosféra. Následně byla přidána suchá rozpouštědla MeOH a EA. Po rozpuštění látky byl přidán 5% Pd/C. Tatož reakce byla zkoušena i za použití 20% Pd(OH)₂, ale lepší výsledky byly dosaženy s 5% Pd/C. Samotná redukce trojné vazby probíhala ve vodíkové atmosféře. Čištění reakční směsi probíhalo přes celit a následně pomocí sloupcové chromatografie. Vzniklý meziprodukt byl použit do dalšího reakčního kroku.

Jak už bylo zmíněno, pro přípravu třetího meziproduktu byla využita Appelova reakce. Smícháním methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoátu (**2**), tetrabromomethanu a trifenyfosfinu v CH₂Cl₂ při 0°C v N₂ atmosféře vznikl methyl 4-(3-bromopropyl)benzoát (**3**), který byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie.

Dalším reakčním krokem byla bazická hydrolyza esteru a následné okyselení soli karboxylové kyseliny, které vedlo k syntéze 4-(3-bromopropyl)benzoové kyseliny (**4**). Nejdříve byl methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoát (**2**) rozpuštěn v acetonu, následovalo přidání vodného roztoku NaOH. Roztok se nechal míchat přes noc. Následně byl z roztoku na vakuové odparce odpařen aceton. Poté byl roztok zředěn vodou a okyselen 6M HCl na pH 1. Separace produktu proběhla filtrací.

Sloučenina 4-(3-bromopropyl)benzoová kyselina (**4**) byla rozpuštěna v toluenu v dusíkové atmosféře při teplotě 74°C. Do roztoku byl přidán SOCl₂. Po 24 hodinách, kdy směs reagovala

při 74°C, byl roztok s produktem 4-(3-bromopropyl)benzoyl chloridem (**5**) zakoncentrován pomocí vakua, promýt čerstvým toluenem a ihned spotřebován v další reakci. Nukleofilní acylovou substitucí byla karboxylová kyselina převedena na velice reaktivní chlorid kyseliny, proto musel být vzniklý meziprodukt ihned použit do navazující reakce.

Předposledním krokem syntézy byla syntéza 4-(3-bromopropyl)-*N*-hydroxybenzamidu (**6**). Bazické složky NaOH a NH₂OH.HCl byly smíchány v ledové lázni, do které se přikapával 4-(3-bromopropyl)benzoyl chlorid (**5**) rozpuštěný v etheru. Směs reagovala po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byl roztok ochlazen na 0°C a byla přidána 2M HCl. Vzniklý meziprodukt byl zfiltrován.

Smícháním 4-(3-bromopropyl)-*N*-hydroxybenzamidu (**6**) a 4-pyridinaldoximu v acetonu byla vytvořena reakční směs, která reagovala přes noc pod zpětným chladičem při teplotě 56°C. Výsledkem této reakce byl finální produkt 1-{3-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]propyl}-4-[(*E*)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromid (**7**).

Pro přípravu druhého finálního produktu 1-{4-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]butyl}-4-[(*E*)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromidu (**10**) stačily tři reakční kroky. První reakční krok vycházel z 4-(4-bromobutyl)benzoové kyseliny, která již byla syntetizována na Katedře chemie, Univerzity Hradec Králové. 4-(4-bromobutyl)benzoová kyselina byla vystavena nukleofilní acylové substituci obdobně jako u prvního produktu, což vedlo k vytvoření 4-(4-bromobutyl)benzoyl chloridu (**8**).

Dalším reakčním krokem byla přeměna chloridu karboxylové kyseliny na hydroxyamid. Sloučenina 4-(4-bromobutyl)benzoyl chlorid (**8**) rozpuštěná v etheru byla přikapávána do roztoku NaOH s NH₂OH.HCl umístěném v ledové lázni. Směs reagovala 30 minut za laboratorní teploty. Následovalo ochlazení na 0 °C a přidání 2M HCl. Vznikl produkt 4-(4-bromobutyl)-*N*-hydroxybenzamid (**9**), který byl čištěn extrakcí a sloupcovou chromatografií. Nižší výtěžnost 27 % vznikla pravděpodobně při sloupcové chromatografii, kdy bylo obtížné izolovat čistý meziprodukt.

Příprava produktu 1-{4-[4-(hydroxykarbamoyl)fenyl]butyl}-4-[(*E*)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium bromidu (**10**) začala rozpuštěním 4-(4-bromobutyl)-*N*-hydroxybenzamidu (**9**) a 4-pyridinaldoximu v acetonu. Reakční směs reagovala přes noc při 56°C za refluxu. Výsledný produkt byl zfiltrován.

5 Závěr

V teoretické části této bakalářské práce byla popsána obecná charakteristika organofosforových sloučenin, kdy byla pozornost zaměřena především na pesticidy a nervově paralytické látky. Dále byly uvedeny účinky těchto látek na živý organismus a zmíněny příklady zástupců jednotlivých skupin. V následujících podkapitolách byl vysvětlen mechanismus organofosforových sloučenin, kde byla pozornost věnována především cholinergnímu systému, jeho jednotlivým součástem a funkcím. Teoretická část se také věnovala klinickým příznakům intoxikace, prognóze, či příčině úmrtí. V dalších podkapitolách se nalézají informace o možnostech profylaxe a léčby v případě otrav organofosforovými sloučeninami.

Experimentální část se zabývala hlavně syntézou meziproductů, které vedly k přípravě dvou finálních monokvarterních oxim-hydroxamátových reaktivátorů. V této části byly detailně popsány jednotlivé postupy a optimalizace některých reakčních kroků. Nakonec u všech meziproductů a produktů popsány některé fyzikálně-chemické vlastnosti.

6 Použitá literatura

- [1] BAJGAR, Jirí. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Advances in Clinical Chemistry* [online]. 2004, **38**, 151–216. ISSN 0065-2423. Dostupné z: doi:10.1016/s0065-2423(04)38006-6
- [2] MIROSLAV, Hirt, Vorel FRANTIŠEK a a KOLEKTIV. *Soudní lékařství II. díl*. B.m.: Grada Publishing a.s., 2016. ISBN 978-80-271-9468-1.
- [3] LINHART, Igor. *Toxikologie: Interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2012. ISBN 978-80-7080-806-1.
- [4] KAMANYIRE, R. a L. KARALLIEDDE. Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occupational Medicine* [online]. 2004, **54**(2), 69–75. ISSN 0962-7480. Dostupné z: doi:10.1093/occmed/kqh018
- [5] BARDODĚJ, Zdeněk. *Úvod do chemické toxikologie / Zdeněk Bardoděj*. 1. vyd. B.m.: Karolinum, 1999. ISBN 978-80-7184-978-0.
- [6] PROKEŠ, Jaroslav. *Základy toxikologie : obecná toxikologie a ekotoxikologie* [online]. 2005 [vid. 2020-03-26]. ISBN 978-80-7262-301-3. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/link/MED00121577>
- [7] PATOČKA, Jiří. Terorismus a moderní chemie. *Vesmír*. 2011, 324–326.
- [8] PITSCHMANN, Vladimír. *Historie chemické války /*. Vyd. 1. B.m.: Military System Line, 1999. ISBN 978-80-902669-0-2.
- [9] HALÁMEK, E. a Z. KOBLIHA. Potential Chemical Warfare Agents. *Chemické listy* [online]. 2011, **105**(5) [vid. 2020-04-01]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1136>
- [10] *Státní úřad pro jadernou bezpečnost* [online]. 1997 [vid. 2020-04-01]. Dostupné z: <https://www.sujb.cz/zakaz-chemickych-zbrani/umluva-o-zakazu-vyvoje-vyroby-hromadeni-zasob-a-pouziti-chemickych-zbrani-a-jejich-zniceni/>
- [11] JEYARATNAM, J. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. 1990.
- [12] KWONG, Tai C. Organophosphate Pesticides: Biochemistry and Clinical Toxicology: *Therapeutic Drug Monitoring* [online]. 2002, **24**(1), 144–149. ISSN 0163-4356. Dostupné z: doi:10.1097/00007691-200202000-00022
- [13] VALE, J.A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters* [online]. 1998, **102–103**, 649–652. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4274(98)00277-X
- [14] *EXTOXNET PIP - DIAZINON* [online]. [vid. 2020-04-15]. Dostupné z: <http://extoxnet.orst.edu/pips/diazinon.htm>
- [15] COX, Caroline. Diazinon: toxicology. *Journal of pesticide reform*. 2000, **20**(2), 15–21.

- [16] *Chemické látky* [online]. 24. říjen 2009 [vid. 2020-04-16]. Dostupné z: <https://web.archive.org/web/20091024140126/http://www.bezjedu.arnika.org/chemicke-latky/parathion>
- [17] PUBCHEM. *Parathion* [online]. [vid. 2020-04-16]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/991>
- [18] *EU Pesticides database - European Commission* [online]. [vid. 2020-04-16]. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1048>
- [19] PUBCHEM. *HSDB : 6573* [online]. [vid. 2020-04-16]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/6573#section=Manufacturing-Use-Information>
- [20] *Wayback Machine* [online]. 18. březen 2006 [vid. 2020-04-20]. Dostupné z: https://web.archive.org/web/20060318130122/http://www.amvac-chemical.com/media/pdf/products/msds/nuvan_7.pdf
- [21] *CDC - Okamžitě ohrožující životní nebo zdravotní koncentrace (IDLH): Dichlorvos - NIOSH Publications and Products* [online]. 2. listopad 2018 [vid. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/niosh/idlh/62737.html>
- [22] WU, 19 září 2011 Mae. Big Court Win For Public Health: Pesticide Dichlorvos Is Bad For Children's Health. *NRDC* [online]. [vid. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://www.nrdc.org/experts/mae-wu/big-court-win-public-health-pesticide-dichlorvos-bad-childrens-health>
- [23] CDC. OG Title. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. 28. březen 2018 [vid. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/index.htm>
- [24] *EXTOXNET PIP - DICHLORVOS* [online]. [vid. 2020-04-20]. Dostupné z: <http://extoxnet.orst.edu/pips/dichlorv.htm>
- [25] STEFAN, Silbernagl a Despopoulos AGAMEMNON. *Atlas fyziologie člověka: překlad 8. německého vydání*. B.m.: Grada Publishing, a.s., 2016. ISBN 978-80-247-4271-7.
- [26] NOVOTNÝ, Ivan a Michal HRUŠKA. *Biologie člověka : [pro gymnázia]*. 4. Praha: Fortuna, 2008. ISBN 978-80-7373-007-9.
- [27] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny* [online]. 2009 [vid. 2020-05-19]. ISBN 978-80-246-1414-4. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/link/MED00166068>
- [28] EGLEN, R. M. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Autonomic and Autacoid Pharmacology* [online]. 2006, **26**(3), 219–233. ISSN 1474-8665, 1474-8673. Dostupné z: doi:10.1111/j.1474-8673.2006.00368.x
- [29] SUSSMAN, J., M. HAREL, F. FROLOW, C. OEFNER, A. GOLDMAN, L. TOKER a I. SILMAN. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* [online]. 1991, **253**(5022), 872–879. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1678899

- [30] GORECKI, Lukas, Jan KORABECNY, Kamil MUSILEK, David MALINAK, Eugenie NEPOVIMOVA, Rafael DOLEZAL, Daniel JUN, Ondrej SOUKUP a Kamil KUČA. SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Archives of Toxicology* [online]. 2016, **90**(12), 2831–2859. ISSN 0340-5761, 1432-0738. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-016-1827-3
- [31] COLOVIC, Mirjana B., Danijela Z. KRSTIC, Tamara D. LAZAREVIC-PASTI, Aleksandra M. BONDZIC a Vesna M. VASIC. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* [online]. 2013, **11**(3), 315–335. ISSN 1570159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X11311030006
- [32] VL, Zslav. ENVIRONMENTÁLNÍ ASPEKTY UŽITÍ ORGANOFOFOROVÝCH A KARBAMÁTOVÝCH PESTICIDŮ SCHVÁLENÝCH K UŽITÍ V ČESKÉ REPUBLICE. *Chem. Listy*. 2011, 5.
- [33] KOL, Pelclová, Daniela a. *Nemoci z povolání a intoxikace*. B.m.: Karolinum Press, 2014. ISBN 978-80-246-2597-3.
- [34] DE BLEECKER, Jan L., Jacques L. DE REUCK a Jan L. WILLEMS. Neurological aspects of organophosphate poisoning. *Clinical Neurology and Neurosurgery* [online]. 1992, **94**(2), 93–103. ISSN 03038467. Dostupné z: doi:10.1016/0303-8467(92)90065-B
- [35] KLEMENT, Cyril. *Mimoriadne udalosti vo verejnom zdravotníctve*. 2011. vyd. B.m.: Pro, 2011. ISBN 978-80-89057-29-0.
- [36] Transant. *SvětVědy.cz* [online]. 19. červenec 2003 [vid. 2020-06-11]. Dostupné z: <http://svetvedy.cz/transant/>
- [37] MUSILEK, Kamil, Martin DOLEZAL, Frank GUNN-MOORE a Kamil KUČA. Design, evaluation and structure-Activity relationship studies of the AChE reactivators against organophosphorus pesticides. *Medicinal Research Reviews* [online]. 2011, **31**(4), 548–575. ISSN 01986325. Dostupné z: doi:10.1002/med.20192
- [38] BAJGAR, Jiří a Jiří KASSA. DEPARTMENT OF TOXICOLOGY AND MILITARY PHARMACY - IMPORTANT PART OF THE FACULTY OF MILITARY HEALTH SCIENCES OF THE UNIVERSITY OF DEFENCE. *Military Medical Science Letters* [online]. 2015, **84**(2), 57–66. ISSN 03727025, 03727025. Dostupné z: doi:10.31482/mmsl.2015.005
- [39] BAJGAR, Jiří, Jiří KASSA, Kamil KUČA, Josef FUSEK a Rudolf ŠTĚTINA. ČASOPIS PRO NEODKLADNOU LÉKAŘSKOU PÉČI. *04/2010*. nedatováno, 12–14. ISSN 1212-1924.
- [40] CONNORS, Nicholas J., Zachary H. HARNETT a Robert S. HOFFMAN. Comparison of Current Recommended Regimens of Atropinization in Organophosphate Poisoning. *Journal of Medical Toxicology* [online]. 2014, **10**(2), 143–147. ISSN 1937-6995. Dostupné z: doi:10.1007/s13181-013-0324-9
- [41] MERCEY, Guillaume, Tristan VERDELET, Julien RENOU, Maria KLIACHYNA, Rachid BAATI, Florian NACHON, Ludovic JEAN a Pierre-Yves RENARD. Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2012, **45**(5), 756–766. ISSN 0001-4842, 1520-4898. Dostupné z: doi:10.1021/ar2002864
- [42] SHARMA, Rahul, Bhanushree GUPTA, Namrata SINGH, J.R. ACHARYA, Kamil MUSILEK, Kamil KUČA a Kallol GHOSH. Development and Structural Modifications of Cholinesterase Reactivators against Chemical Warfare Agents in Last Decade: A Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*

[online]. 2015, **15**(1), 58–72. ISSN 13895575. Dostupné z: doi:10.2174/1389557514666141128102837

- [43] WOREK, F., G. REITER, P. EYER a L. SZINICZ. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Archives of toxicology*. 2002, **76**(9), 523–529.
- [44] JOKANOVIĆ, Milan. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicology letters*. 2009, **190**(2), 107–115.
- [45] KUČA, Kamil, Daniel JUN a Kamil MUSILEK. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2006, **6**(3), 269–277.
- [46] KASSA, Jiří a Jiří CABAL. A comparison of the efficacy of acetylcholinesterase reactivators against cyclohexyl methylphosphonofluoridate (GF agent) by in vitro and in vivo methods. *Pharmacology & toxicology*. 1999, **84**(1), 41–45.
- [47] PATOCKA, J., Jiří CABAL, K. KUČA a Daniel JUN. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *J. Appl. Biomed.* 2005, **3**(2), 91–99.
- [48] AMITAI, Gabriel, Rellie GEZ, Lily RAVEH, Nira BAR-NER, Ettie GRAUER a Shira CHAPMAN. Novel bifunctional hybrid small molecule scavengers for mitigating nerve agents toxicity. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2016, **259**, 187–204. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2016.04.036