

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

Syntéza nových pyridinaldoximových monokvarterních solí jako potenciálních reaktivátorů butyrylcholinesterasy

Bakalářská práce

Autor: Lucie Odstrčilová

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: Chemie

Vedoucí práce: RNDr. Dávid Maliňák, PhD.

Hradec Králové

červenec 2020



Zadání bakalářské práce

Autor: Lucie Odstrčilová

Studium: S17CH009BP

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: Chemie

Název bakalářské práce: **Syntéza nových pyridinaldoximových monokvarterních solí jako potenciálních reaktivátorů butyrylcholinesterasy**

Název bakalářské práce AJ: Synthesis of new pyridinaldoxime monoquaternary salts as potential butyrylcholinesterase reactivators

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

1. Rešerše syntézy a biologické aktivity sloučenin testovaných jako potenciální reaktivátory butyrylcholinesterasy
2. Syntéza, určení struktury a fyzikálně-chemických vlastností nově připravených monokvarterních amoniových solí obsahujících pyridinaldoximovou a benzenamidickou složku, které budou následně poskytnuty na biologické testování jako potenciální reaktivátory butyrylcholinesterasy.
3. Sepsání bakalářské práce.

Databáze Reaxys, Chemical abstract, Web of Science, Scopus.

Garantující pracoviště: Katedra chemie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Dávid Maliňák, PhD.

Oponent: PharmDr. Ondřej Benek, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 26.6.2019

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny zdroje, ze kterých jsem čerpala.“

V Hradci Králové dne 22. 7. 2020



Lucie Odstrčilová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat RNDr. Dávidu Maliňákovi, PhD. za odborné vedení, za spoustu rad a připomínek k napsání práce, poskytnutí odborných textů a předání cenných zkušeností v laboratoři. Tímto děkuji i konzultantovi RNDr. Miroslavu Psoťkovi, PhD. za pomoc při práci v laboratoři a za mnoho užitečných rad. Mé poděkování patří také Ing. Janě Svobodové, Ph.D. a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za naměření NMR spekter a PharmDr. Rudolfu Andryšovi, Ph.D. za naměření MS spekter. Vznik práce byl umožněn díky institucionální podpoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové a byla podpořena projekty Grantové agentury České republiky (18-01734S, 19-13628S).

Anotace

V této bakalářské práci popisuji syntézu nových pyridinaldoximových monokvarterních solí jako potenciálních reaktivátorů butyrylcholinesterasy. V teoretické části se zabývám strukturou acetylcholinesterasy i butyrylcholinesterasy, mechanismem inhibice organofosforovými látkami a následnou reaktivací těchto inhibovaných enzymů pomocí oximů. Podrobněji popisuji strukturu reaktivátorů a jejich účinky na jednotlivé organofosfáty. V neposlední řadě zmiňuji také syntézu asoximu. Jeho struktura, obsahující 2-pyridinaldoximovou a amidickou část, se stala základem pro design mnou syntetizovaných nových sloučenin. V experimentální části popisuji přípravu finálních produktů z lehkou dostupných výchozích látek, a to šestikrokovou syntézou, která zahrnuje Sonogashirovu reakci, katalytickou hydrogenaci, Appelovu reakci, dvě reakce, které probíhají mechanismem nukleofilní acylové substituce a závěrečnou bimolekulární nukleofilní substituci.

Klíčová slova

acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, organofosforové látky, oximy, reaktivátory

Anotation

In this bachelor thesis I describe the synthesis of new pyridinaldoxime monoquaternary salts as potential reactivators of butyrylcholinesterase. In the theoretical part I deal with the structure of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, the mechanism of inhibition by organophosphorus substances and the subsequent reactivation of these inhibited enzymes by means of oximes. I describe in more detail the structure of reactivators and their effects on individual organophosphates. Last but not least, I also mention the synthesis of asoxime. Its structure, containing the 2-pyridinaldoxime and amide moieties, became the basis for the design of the new compounds synthesized by me. In the experimental part, I describe the preparation of final products from readily available starting materials by a six-step synthesis that includes Sonogashira reaction, catalytic hydrogenation, Appel reaction, two reactions that proceed by nucleophilic acyl substitution and final bimolecular nucleophilic substitution.

Keywords

acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, organophosphorus substances, oximes, reactivators

Obsah

| | |
|---|----|
| Úvod..... | 8 |
| 1 Teoretická část | 10 |
| 1.1 Neurotransmitery | 10 |
| 1.2 Acetylcholin..... | 10 |
| 1.3 Acetylcholinesterasa | 11 |
| 1.3.1 Hydrolýza acetylcholinu | 12 |
| 1.4 Cholinergní systém | 12 |
| 1.4.1 Nikotinové receptory..... | 13 |
| 1.4.2 Muskarinové receptory | 13 |
| 1.5 Butyrylcholinesterasa | 14 |
| 1.5.1 Struktura a funkce butyrylcholinesterasy..... | 15 |
| 1.6 Inhibice cholinesteras organofosforovými látkami | 16 |
| 1.6.1 Mechanismus účinku organofosforových látek | 17 |
| 1.7 Reaktivace cholinesteras..... | 18 |
| 1.7.1 Pralidoxim..... | 19 |
| 1.7.2 Methoxim..... | 20 |
| 1.7.3 Trimedoxim..... | 20 |
| 1.7.4 Obidoxim | 21 |
| 1.7.5 Asoxim (HI-6)..... | 21 |
| 2 Design | 24 |
| 3 Cíle práce | 25 |
| 4 Výsledky a diskuse | 26 |
| 5 Experimentální část..... | 35 |
| 5.1 Příprava monokvarterních amoniových solí s čtyřuhlíkatým řetězcem | 36 |
| 5.2 Příprava monokvarterních amoniových solí s trojuhlíkatým řetězcem | 40 |
| Závěr..... | 44 |
| Použitá literatura | 45 |

Seznam použitých zkratek v textu

| | |
|-------------------|--------------------------------------|
| ACh | acetylcholin |
| AChE | acetylcholinesterasa |
| BuCh | butyrylcholin |
| BuChE | butyrylcholinesterasa |
| CAS | katalyticky aktivní místo |
| ChAT | cholinacetyltransferasa |
| ChE | cholinesterasa |
| CNS | centrální nervový systém |
| DMF | <i>N,N</i> -dimethylformamid |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| ekv | ekvivalent |
| Et ₃ N | triethylamin |
| EtOAc | ethylacetát |
| GABA | kyselina γ -aminomáselná |
| h | hodina |
| HEB | hematoencefalická bariéra |
| l.t. | laboratorní teplota |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| NPL | nervově paralytické látky |
| OL | organofosforové látky |
| PAS | periferní anionické místo |
| Ph ₃ P | trifenylfosfin |
| PNS | periferní nervový systém |
| S _N 2 | bimolekulární nukleofilní substituce |
| S _N Ac | nukleofilní acylová substituce |
| THF | tetrahydrofuran |
| TLC | tenkovrstvá chromatografie |
| UHK | Univerzita Hradec Králové |

Úvod

Organofosforové látky (OL), které se hojně využívají v zemědělství jako pesticidy, jsou estery kyseliny fosfonové, fosfinové a fosforečné [1]. Mezi nejznámější používané přípravky patří parathion, malathion nebo chlorpyrifos. Podle WHO se ročně těmito pesticidy otráví až 2 miliony lidí, z toho 30 % má velmi těžký průběh a 15 % případů končí úmrtím postiženého jedince [2].

OL bývají častokrát zneužity i jako chemické bojové látky s nervově paralytickým účinkem. Patří sem například sarin, soman, tabun, VX látky nebo ruský novičok. Nejznámějším případem zneužití sarinu je útok na tokijské metro skupinou Óm šinrikjó v roce 1995. Na následky otravy zemřelo 12 osob, a to hlavně díky nízké čistotě sarinu [3]. Zneužitím VX je případ smrti Kim Čong-nama v roce 2017, kterému byla do obličeje vsříknuta jedovatá látka [4]. Nejnovějším případem použití nervově paralytické látky (NPL) je otrava bývalého ruského agenta Sergeje Skripala a jeho dcery novičokem v březnu 2018 [5].

OL se zneužívají jako zbraň hromadného ničení, protože pronikají do organismu všemi branami vstupu a vyznačují se rychlým nástupem účinku. Přenos nervového vzruchu je zprostředkován neurotransmiterem, acetylcholinem (ACh), který se váže na acetylcholinový receptor na synaptické membráně. Toto navázání způsobí změnu konformace receptoru a následný průchod iontů do buňky a z buňky. To má za následek šíření elektrického potenciálu. Neurotransmitter však působí jen na nezbytně krátký čas pro přenos signálu a po svém navázání na receptor musí být rozložen pomocí acetylcholinesterasy (AChE). OL mají však schopnost inhibovat AChE, tzn. neurotransmitter není hydrolyzován, hromadí se na synapsích a dochází k nadměrnému dráždění cholinergních receptorů. Projevy intoxikace jsou mióza, zvýšená salivace, lakrimace a perspirace, svalová ochablost, útlum dýchacího centra až smrt [6].

Základem terapie je použití funkčních antidot (atropin) a kauzálních antidot, tzv. reaktivátorů, které mají schopnost inhibovanou AChE reaktivovat (např. pralidoxim, methoxim, asoxim (HI-6)) [6].

V poslední době se zvyšuje zájem o syntézu reaktivátorů butyrylcholinesterasy (BuChE). BuChE se nachází v krevní plazmě, centrální (CNS) a periferní nervové soustavě (PNS). Hraje významnou roli v detoxikaci OL a dalších xenobiotik (např. aspirin, kokain, heroin). Zároveň se testuje jako bioscavenger. To je založeno na principu interakce BuChE s OL a jejich následnou inaktivací. Díky tomu dochází k ochraně AChE před její inhibicí.

Cílem práce je syntetizovat nové monokvarterní soli, které budou působit jako reaktivátory BuChE a bude se ověřovat, zdali jsou účinnější než biskvarterní soli. Současně se

bude testovat schopnost reaktivovat inhibovanou AChE, která se nachází hlavně v mozku. Oproti biskvarterním solím by měly snadněji prostupovat přes hematoencefalickou bariéru (HEB) a mít vyšší reaktivační schopnost.

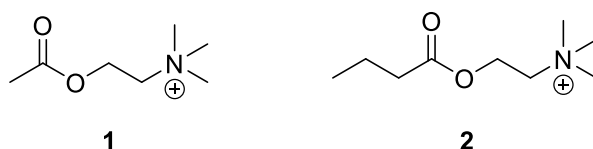
1 Teoretická část

1.1 Neurotransmitery

Neurotransmitery (neuromediátory) jsou molekuly, které se uvolňují z presynaptické oblasti do synaptické štěrbině a následně dochází k navázání na konkrétní receptory na postsynaptické membráně druhého neuronu, což způsobí změnu permeability iontových kanálů [7].

V postsynaptické membráně se nachází cílové receptory, které mají afinitu k jednotlivým neurotransmiterům. Při navázání neuromediátoru na příslušný receptor dojde ke změně konformace receptoru a vyvolání specifické odezvy [7].

Acetylcholin (ACh) (1) a butyrylcholin (BuCh) (2) (Obrázek 1) jsou neurotransmitery, které obsahují ve své struktuře kvartérní amoniový kationt [8].



Obrázek 1: Struktura ACh (1) a BuCh (2).

1.2 Acetylcholin

ACh je ester kyseliny octové a cholinu. Syntetizuje se v cytoplazmě nervových zakončení z acetylkoenzymu A (3) a cholinu (4), který vzniká v mitochondriích, působením enzymu cholinacetyltransferasou (ChAT) (Schéma 1). Primárním místem tvorby cholinu jsou játra, kde dochází k methyloaci ethanolaminu a následnému vzniku cholinu [8].

ACh se skladuje ve vezikulách nervových zakončení. Hladina skladovaného ACh je konstantní a syntéza se přizpůsobuje stupni jeho uvolňování [8].

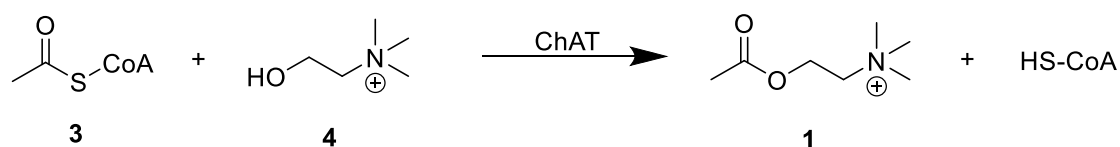
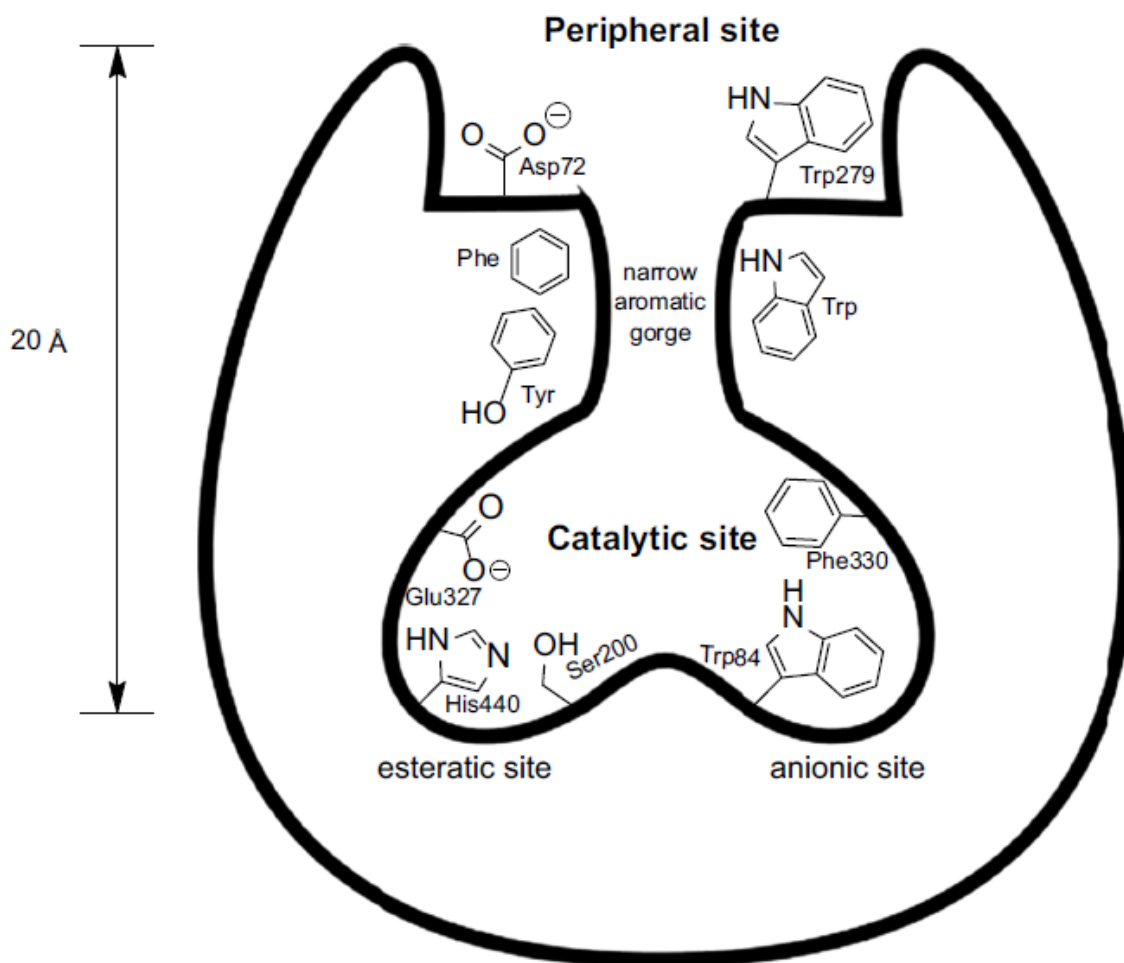


Schéma 1: Syntéza ACh (1) z acetyl-CoA (3) a cholinu (4).

1.3 Acetylcholinesterasa

Acetylcholinesterasa (AChE; UniProtKB-P04058) patří do skupiny serinových hydroláz. To jsou enzymy, v jejichž aktivním místě se nachází aminokyselina serin [9].

Monomer AChE s molekulovou hmotností kolem 60 kDa je elipsovité molekula, která se skládá z 12ti vláknového centrálního β -skládaného listu obklopeného 14ti α -helixy. Periferní anionické místo (PAS) je situováno na povrchu monomeru. Tato část má schopnost vázat se na mnoho různých typů ligandů, a tím ovlivňuje konformaci aktivního místa. Katalyticky aktivní místo (CAS), které je umístěno v aromatické šterbině v hloubce 20 Å, je tvořeno ze dvou podjednotek: esterová část obsahuje katalytickou triádu aminokyselin – Ser200, His440 a Glu327. Anionická podjednotka se skládá z Trp84, Phe330 a Phe331, jejíž rolí je správná orientace pozitivně nabitého substrátu pro vstup a následné navázání do aktivního místa (Obrázek 2) [10].



Obrázek 2: Struktura monomeru AChE [11].

1.3.1 Hydrolýza acetylcholinu

Hydroxylová skupina serinu AChE nukleofilně atakuje elektrofilní atom uhlíku karbonylové skupiny ACh. Dočasně se vytvoří kovalentní vazba mezi AChE a ACh. V dalším kroku vzniká acetylderivát a odštěpuje se cholin. Atom dusíku histidinu má volný elektronový pár, a tudíž může dojít k vazbě s atomem vodíku vody, která vstupuje do reakce. Současně se hydroxidový anion váže na karbonylový uhlík acetylderivátu za tvorby tetraedrického meziproduktu. V dalším kroku atom dusíku histidinu tvoří přechodnou vazbu s atomem kyslíku původní hydroxylové skupiny serinu. Následuje rychlá hydrolýza acylovaného enzymu za vzniku kyseliny octové a obnovení AChE (Schéma 2) [10].

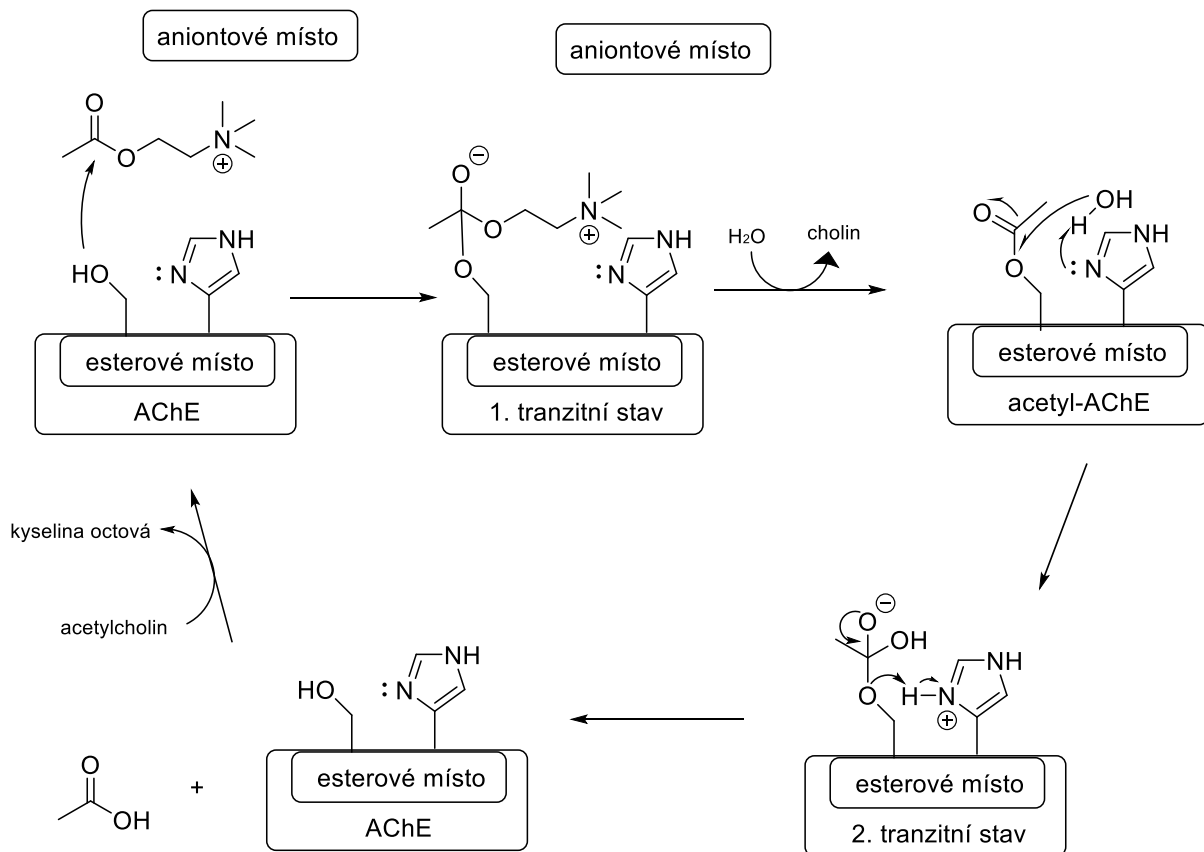


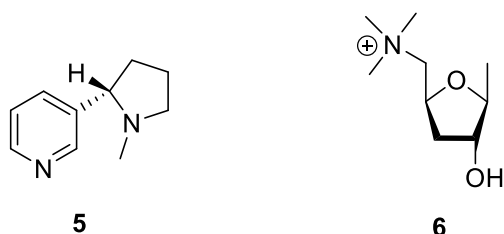
Schéma 2: Hydrolýza ACh katalyzovaná AChE.

1.4 Cholinergní systém

Prostřednictvím přicházejícího akčního potenciálu v presynaptické části dochází ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů a následnému uvolnění ACh do synaptické štěrbině a změně

vlastností membrány. Tato změna vyvolá zvýšení propustnosti membrány pro Na^+ , K^+ a Ca^{2+} ionty [12].

Rozlišujeme dva typy ACh receptorů: nikotinové a muskarinové. Receptory jsou odvozeny od nikotinu (5) a muskarinu (6) (Obrázek 3), protože stejně jako ACh tyto receptory aktivují, tzn. jsou agonisté [12].



Obrázek 3: Struktura nikotinu (5) a muskarinu (6).

1.4.1 Nikotinové receptory

Nikotinové receptory jsou iontové kanály řízené ligandem, které jsou propustné pro Na^+ , K^+ a Ca^{2+} ionty. Existují dva typy: muskulární typ (N_M receptor), který se nachází hlavně na nervosvalové ploténce a neuronální typ (N_N receptor) přítomný ve vegetativních gangliích na membráně postsynaptické oblasti. V CNS tento typ receptorů funguje hlavně jako receptor pro jiné systémy, např. GABAergní, dopaminergní nebo serotoninergní [8].

Nadměrná stimulace nikotinových receptorů je způsobena zvýšenou koncentrací ACh na sympatických gangliích a nervosvalových ploténkách. Mezi nikotinové příznaky patří třes, záškuby a křeče v příčně pruhovaných svalech, které mohou dojít až k paralýze kosterního svalstva [6].

1.4.2 Muskarinové receptory

Muskarinové receptory jsou receptory spřažené s G-proteinem, který řídí iontové kanály. Existuje pět typů receptorů: M_{1-5} . M_1 receptor zprostředkovává reakci díky G-proteinu. Konečným výsledkem série signalizací je snížení propustnosti membrány pro K^+ ionty. M_2 receptory snižují vyplavování ACh v kůře v CNS. M_3 receptory mají za následek stimulaci sekrece žláz a stahy hladkého svalstva orgánů [8].

Nadměrná stimulace muskarinových receptorů se projevuje zúžením zornic, zvýšeným sliněním, pocením a slzením, poklesem krevního tlaku a bolestmi břicha [6]. Antagonistou muskarinových receptorů je atropin [12].

1.5 Butyrylcholinesterasa

Butyrylcholinesterasa (BuChE; UniProtKB-P06276) se také nazývá jako pseudocholinesterasa nebo plazmová cholinesterasa, neboť se nachází hlavně v krevní plazmě. Je také přítomna v CNS a PNS, kde zajišťuje regulaci cholinergního systému. Stejně jako AChE patří mezi serinové hydrolasy [13]. BuChE štěpí BuCh (2) na cholin (4) a kyselinu butanovou (7) (Schéma 3).

BuChE hraje důležitou roli v detoxikaci mnoha xenobiotik. Např. fytostigmin a kokain jsou hydrolyzovány na neaktivní produkty, aspirin je hydrolyzován na kyselinu salicylovou, heroin je diester, který se působením BuChE přeměňuje na morfin. To znamená, že BuChE hraje významnou roli v metabolismu toxických látek [9].

BuChE se v současné době testuje jako bioscavenger proti OL. Funkce BuChE spočívá v deaktivaci OL v krvi za současné reaktivace tohoto enzymu. Díky vychytávání OL neproniknou do mozku, kde by mohly inhibovat AChE, jejíž funkcí je hydrolýza ACh a následný přenos nervového signálu [14].

U zdravého člověka je aktivita BuChE konstantní, avšak mnoho patologických stavů ji může snížit nebo zvýšit. Např. pacienti s diabetem, jedinci trpící nadváhou, ale také lidé, kteří mají tzv. missense mutaci (kodon, který má zaměněnou bázi, kóduje jinou aminokyselinu, než původně [15]) genu BuChE mají aktivitu enzymu vyšší, naopak poškození jater, ledvin, podvýživa nebo rozsáhlé popáleniny jsou spojeny se snížením aktivity. Jedinci s nedostatkem BuChE mají vyšší citlivost na určité toxické látky. Bývají často vystaveni účinkům předávkování, protože dochází k pomalejší eliminaci noxy z organismu [16].

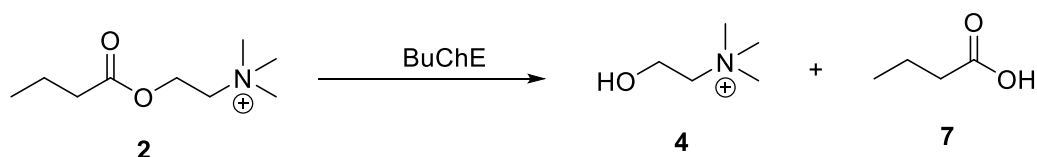


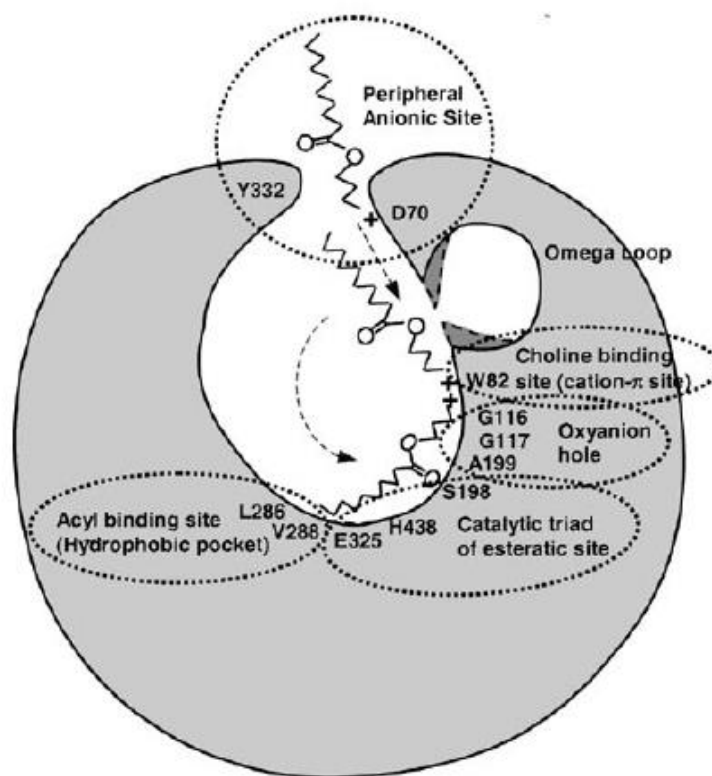
Schéma 3: Štěpení BuCh (2) pomocí BuChE.

1.5.1 Struktura a funkce butyrylcholinesterasy

BuChE (Obrázek 4) je složena ze čtyř identických podjednotek (každá 85 kDa), které spolu navzájem interagují prostřednictvím čtyřšroubovice na C-koncích. Monomer je tvořen přibližně z 574 aminokyselin a nese několik sacharidových řetězců vázaných na asparagin. Peptid bohatý na polyprolin leží ve středu svazku čtyřšroubovice a je vázán pomocí vodíkové vazby na Trp543, Trp550, Trp557 a na tři další hydrofobní zbytky, které se nachází na stejné straně molekuly [8, 14].

Každý monomer má 20 Å hlubokou a úzkou štěrbinu s aktivním místem, ve kterém se nachází 55 aminokyselin. V ústí štěrbině se nachází PAS, mj. s aminokyselinami Asp70 a Tyr332, které se podílí na počáteční vazbě s pozitivně nabitými substráty. Jestliže je kladně nabitý substrát navázán na enzym vytvořením komplexu s aromatickým kruhem Tyr332 za současné interakce substrátu s negativně nabitým Asp70, dojde ke změně konformace monomeru. Tato změna vyvolá přiblížení ramen enzymu a substrátu je umožněno proniknout dovnitř k Trp82 vazebného místa cholinu [17].

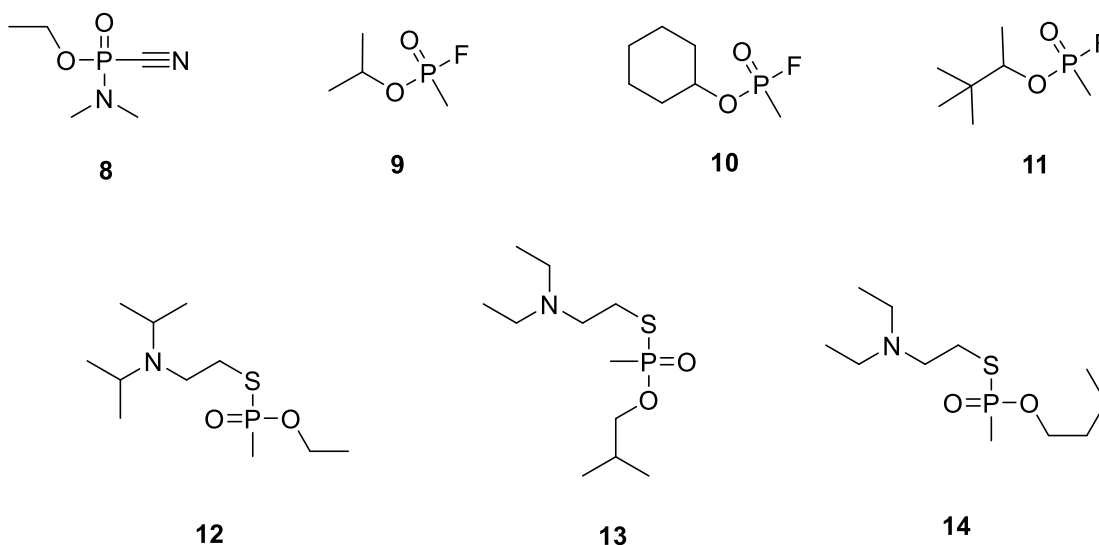
Oxyaniontová díra v blízkosti vazebného místa pro cholin zahrnuje aminokyseliny Gly116, Gly117 a Ala199. Její funkcí je otáčení substrátu z vertikální do horizontální polohy, kde může být posléze hydrolyzován Ser198. K hydrolyze může dojít pouze za přítomnosti Ser198, His438 a Glu325. Imidazolový kruh His438 přenáší elektrony z Glu325 na Ser198, tzn. hydroxylový kyslík Ser198 se stává nukleofilem. Nukleofilní atak tohoto hydroxylovaného kyslíku na esterovou vazbu substrátu vede k tvorbě komplexu acyl-enzym a volného cholinu. Následně je acylová skupina hydrolyzována z komplexu se Ser198 nukleofilním atakem vody aktivované odebráním protonu z His438 [17].



Obrázek 4: Struktura BuChE [17].

1.6 Inhibice cholinesteras organofosforovými látkami

OL, které se v praxi nejčastěji využívají v zemědělství jako insekticidy (parathion, malathion, chlorpyrifos), jsou organické sloučeniny fosforu, tzn. ve formě derivátů kyseliny fosfonové, fosfinové a fosforečné [1]. Mnohem nebezpečnější jsou však nervově paralytické látky (NPL), které byly mnohokrát zneužity jako chemické bojové látky. NPL se dělí na dvě skupiny – G látky a V látky. Obě kategorie jsou vysoce toxické, do organismu pronikají všemi branami vstupu a vykazují rychlý nástup účinku. Mezi G látky patří tabun (8), sarin (9), cyklosarin (10), soman (11). V látky zahrnují VX (12), ruskou VX (13) a čínskou VX (14) (Obrázek 5) [6].



Obrázek 5: Struktury chemických bojových látek **8-14**.

1.6.1 Mechanismus účinku organofosforových látek

Mechanismem účinku všech OL je inhibice AChE, která rozkládá ACh na cholin a acetát. Dochází k narušení cholinergního přenosu nervového signálu vlivem nahromadění ACh na receptorech a následné nadměrné stimulaci cholinergních receptorů, která může vyústit až v akutní cholinergní krizi [6].

OL vstupuje štěrbinou AChE do CAS, kde dojde k nukleofilnímu ataku atomu kyslíku v molekule serinu na atom fosforu organofosfátu. Dojde k tvorbě fosforylovaného serinu za současného uvolnění lehce odstupujícího iontu (Schéma 4). Molekula histidinu v CAS není schopna vytvořit přechodnou vazbu s hydroxylovou skupinou serinu, tzn. obnovení inhibované AChE probíhá velmi pomalu [11].

Současně probíhá intramolekulární dealkylace substituentu z atomu fosforu, což je reakce, při které je AChE změněna tak, že ji již nelze reaktivovat. Tento proces pozměňování AChE je označován také jako „stárnutí“ (Schéma 4). Poločas stárnutí závisí na typu OL, např. pro soman (**11**) to jsou 2 až 4 minuty, 5 hodin pro sarin (**9**) a poločas stárnutí AChE inhibovanou tabunem (**8**) je 46 hod [11].

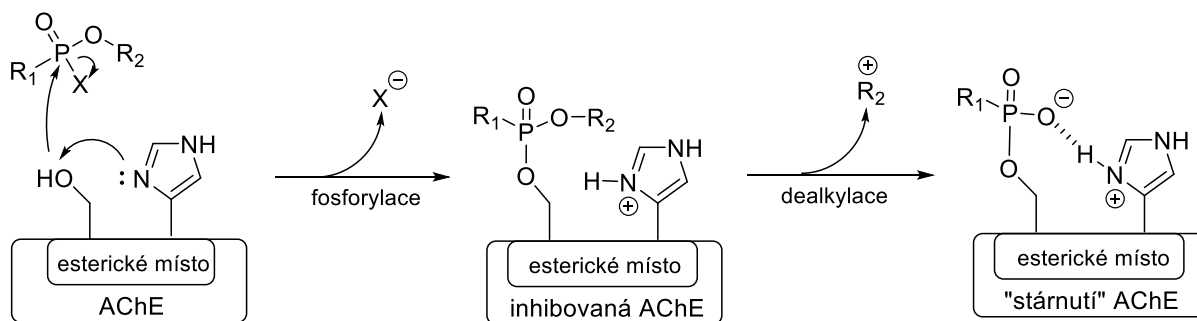


Schéma 4: Inhibice AChE pomocí OL a proces „stárnutí“.

1.7 Reaktivace cholinesteras

Reaktivace cholinesteras (ChE) probíhá dvoustupňovou reakcí. V prvním kroku oximátový aniont přistupuje k atomu fosforu a vytvoří s ním kovalentní vazbu. Následně dojde k vytěsnění fosforylového zbytku, uvolnění ChE a vzniku fosforylovaného oximu [11].

Oximová skupina v molekule reaktivátoru hraje důležitou roli v reaktivaci, jelikož ve fyziologickém prostředí tvoří oximátový aniont, a tudíž je silný nukleofil schopný rozštěpit vazbu ChE a OL (Schéma 5) [18].

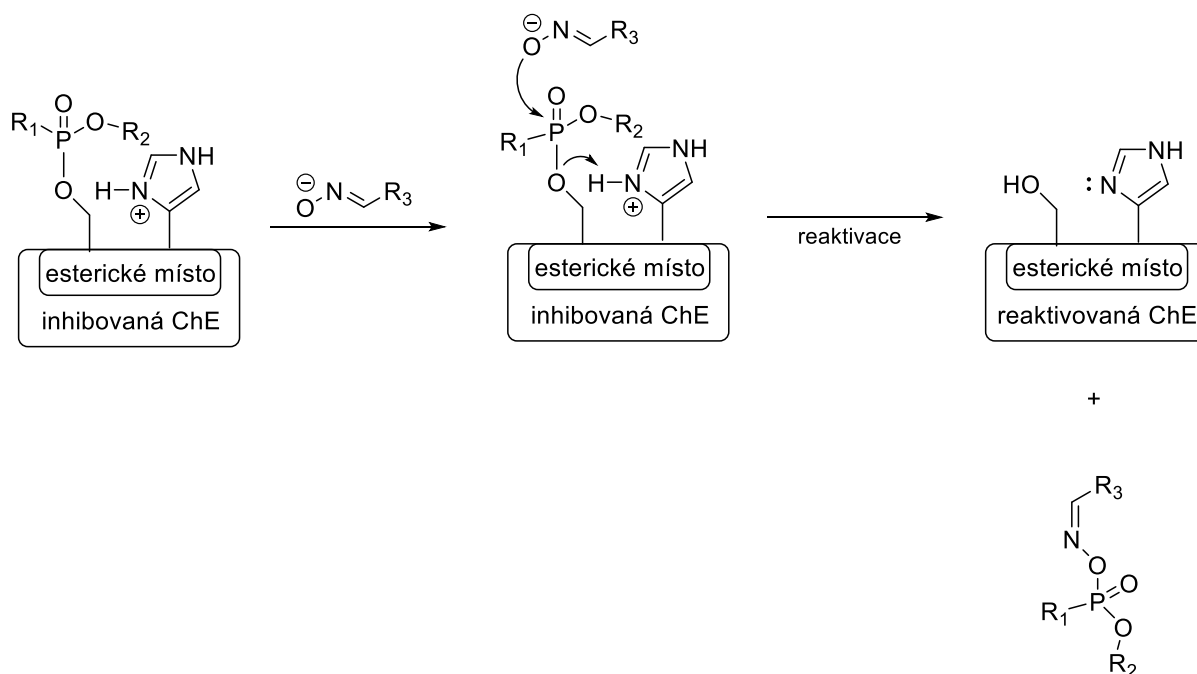
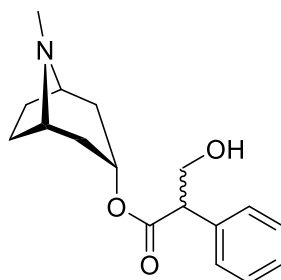


Schéma 5: Reaktivace ChE pomocí oximu.

Po intoxikaci je nejdůležitější zamezit dalšímu pronikání OL do organismu a zabezpečit základní životní funkce jedince [6].

Antidotní terapie zahrnuje podávání anticholinergik (funkční antidota) současně s reaktivátory cholinesteras (kauzální antidota). Anticholinergika blokují účinek nahromaděného ACh na cholinergních receptorech. Nejčastěji se využívá atropin (**15**) (Obrázek 6), který zabraňuje nadměrné stimulaci cholinergních receptorů hlavně na periferních muskarinových receptorech. Centrální příznaky intoxikace neovlivňuje téměř vůbec, protože špatně prochází přes HEB [6].



15

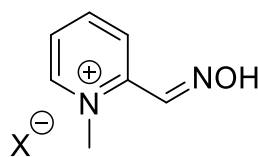
Obrázek 6: Struktura atropinu (**15**).

Reaktivátory obnovují aktivitu ChE. Nejběžnějšími reaktivátory jsou látky s oximovou skupinou, které budou podrobněji popsány v následující části.

1.7.1 Pralidoxim

Pralidoxim (**16**) (Obrázek 7) byl syntetizován v USA v roce 1955 [19]. Při analýze bylo zjištěno, že je velmi účinný při reaktivaci AChE inhibované sarinem (**9**) nebo VX (**12**), zatímco v reaktivaci AChE inhibované tabunem (**8**) nebo somanem (**11**) není příliš úspěšný [20].

Strukturu pralidoximu tvoří pyridinový cyklus s oximovou skupinou v poloze C2 a díky jednomu kvarternímu atomu dusíku je jeho průchod přes HEB lepší než reaktivátory se dvěma nabitými atomy dusíku v molekule [21].



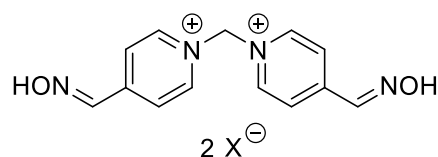
16

Obrázek 7: Struktura pralidoximu (**16**).

1.7.2 Methoxim

Methoxim (**17**) (Obrázek 8) patří do skupiny biskvarterních amoniových solí se dvěma oximovými skupinami v polohách C4. Pyridinové cykly jsou spojeny methylenovým řetězcem [21].

Stejně jako pralidoxim (**16**) je dobře účinný při reaktivaci AChE inhibované sarinem (**9**), nicméně jeho efektivita při reaktivaci AChE inhibované tabunem (**8**) je nižší [22, 23]. Pravděpodobně je to způsobeno strukturou tabunu. Na atomu fosforu je vyšší hustota elektronů, tudíž je nukleofilní atak reaktivátoru méně pravděpodobný [21].



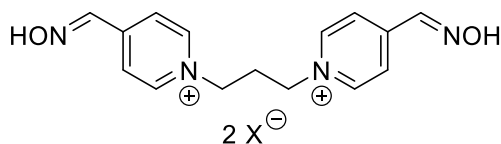
17

Obrázek 8: Struktura methoximu (**17**).

1.7.3 Trimedoxim

Trimedoxim (**18**) (Obrázek 9) patří do skupiny biskvarterních amoniových solí se dvěma oximovými skupinami v polohách C4. Dva pyridinové cykly jsou spojeny propylenovým řetězcem [21].

Je toxický, nicméně je velice účinný při reaktivaci AChE inhibované sarinem (**9**), VX (**12**), ale je to také jeden z neúčinnějších reaktivátorů na AChE inhibovanou tabunem (**8**) [22, 24].



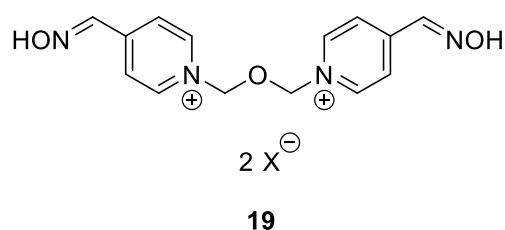
18

Obrázek 9: Struktura trimedoximu (**18**).

1.7.4 Obidoxim

Obidoxim (**19**) (Obrázek 10) je biskvarterní amoniová sůl se dvěma oximovými skupinami v polohách C4. Dva pyridinové cykly jsou spojeny etherovým řetězcem [21].

Ve srovnání s trimedoximem (**18**) je mnohem více efektivnější v reaktivaci AChE inhibované tabunem (**8**). Na druhou stranu je méně účinnější na AChE inhibovanou somanem (**11**), na rozdíl od trimedoximu (**18**) či pralidoximu (**16**) [25–28].

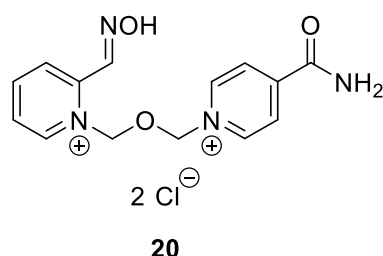


Obrázek 10: Struktura obidoximu (**19**).

1.7.5 Asoxim (HI-6)

Asoxim chlorid (HI-6; **20**) (Obrázek 11) je biskvarterní amoniová sůl s oximovou skupinou v poloze C2 a s amidovou skupinou na druhém pyridinovém skeletu. Dva pyridinové cykly jsou spojeny etherovým řetězcem [21].

Bylo zjištěno, že je asoxim chloridu (HI-6; **20**) účinnější při otravě somanem (**11**), sarinem (**9**) i VX (**12**) více než obidoxim (**19**). Na druhou stranu při reaktivaci AChE inhibované tabunem (**8**) nemá vůbec žádný vliv. Největší výhodou asoxim chloridu (HI-6; **20**) oproti jiným reaktivátorům je jeho minimální toxicita, na druhou stranu je nestabilní ve vodném prostředí. I přesto je však považován za nejvšestrannější reaktivátor [21, 29].



Obrázek 11: Struktura asoxim chloridu (HI-6; **20**).

1.7.5.1 Syntéza asoximu (HI-6)

Asoxim chlorid (HI-6; **20**) byl připraven několika způsoby. Jedním z nich je Hsiaova syntéza, která vychází z 2-pyridinaldoximu (**21**). Prvním krokem je reakce etheru **22** S_N2 mechanismem s aldoximem **21** v prostředí CH₃CN jako rozpouštědla. Následně je do reakce přidán pyridin-4-karboxamid (**23**). Mimo hlavní produkt, asoxim dimethylsulfát (**24**), vznikají také tři vedlejší produkty **25-27**. Čistý asoxim dimethylsulfát (**24**) je získáván rekrystalizací (CH₃OH, H₂O a CH₃CH₂OH/H₂O) ve výtěžku 11 %. Finálním krokem je přeměna produktu na asoxim chlorid (**20**) pomocí iontové výměny (Schéma 6) [21, 30].

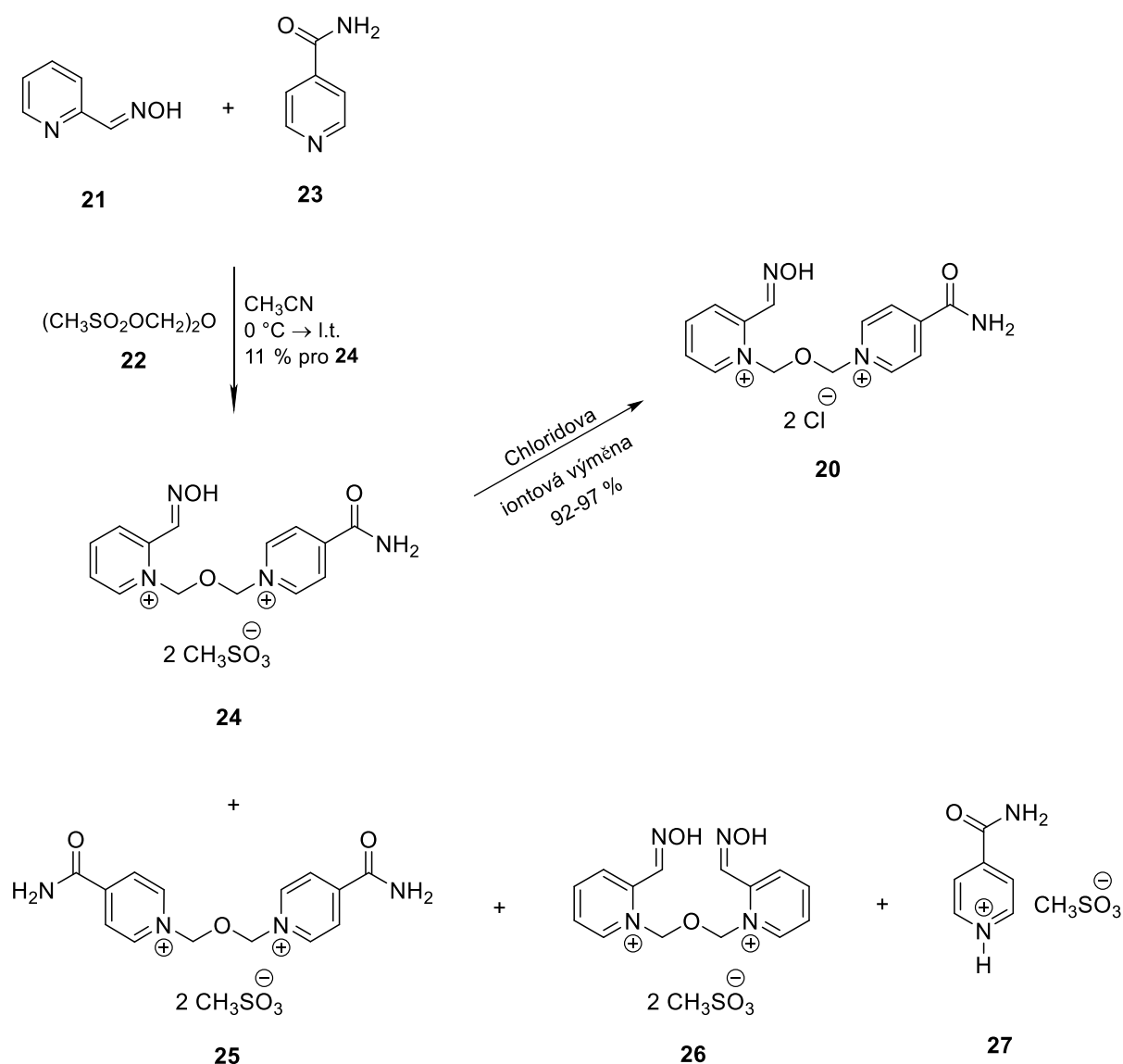


Schéma 6: Hsiaova syntéza asoxim chloridu (HI-6; **20**).

Další možností přípravy HI-6 je Huangova syntéza začínající S_N2 reakcí aldoximu **21** s bis(chlormethyl)etherem (**28**) za vzniku 1-((chloromethoxy)methyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium chloridu (**29**), který následně reaguje s amidem **23** v DMF při teplotě 35-40 °C. Finálním produktem reakce je asoxim chlorid (**20**) v celkovém výtěžku 76 % (Schéma 7) [21, 31].

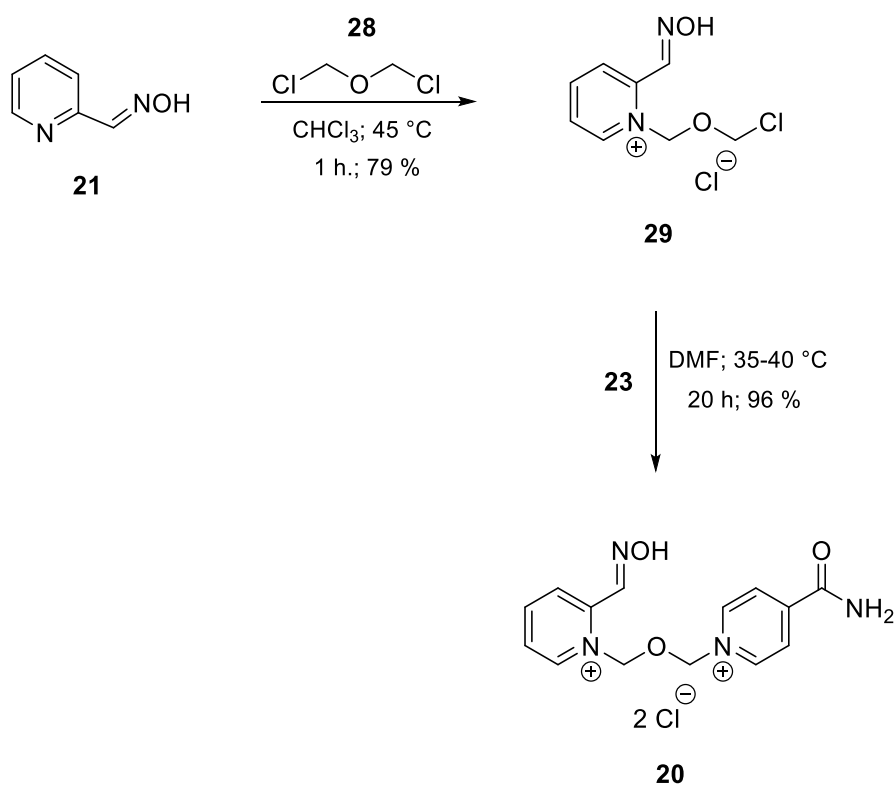


Schéma 7: Huangova syntéza asoxim chloridu (HI-6; **20**).

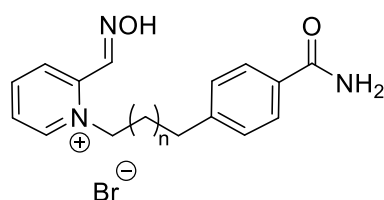
2 Design

Táto bakalárská práca je zaměřena na syntézu nových pyridinaldoximových monokvarterních solí jako reaktivátorů BuChE, které můžou mít lepší reaktivaci schopnosti než doposud navržené sloučeniny. Současně se bude testovat jejich účinnost v reaktivaci BuChE ve srovnání s již připravenými biskvarterními solemi.

Vedle toho bude také zkoumána schopnost dané sloučeniny reaktivovat AChE, která se nachází především v mozku. Oproti biskvarterním solím mají námi navržené monokvarterní soli ve svojí struktuře pouze jeden pozitivně nabitý atom dusíku, tzn. jsou lipofilnější, a tedy by měly být lépe prostupné přes HEB, kde jsou schopny reaktivovat AChE.

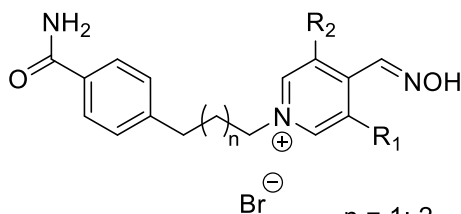
Práce je zaměřena také na vliv arylalkylového postranního řetězce, který je zdrojem π elektronů. Při navázání reaktivátoru na BuChE se tedy bude zkoumat schopnost interakce s PAS BuChE prostřednictvím π -kation interakcí nebo π - π interakcí.

Kromě toho hraje velkou roli poloha oximové skupiny na kvarterním pyridiniovém cyklu. Bylo zjištěno, že reaktivátory s oximovou skupinou v poloze C2 a C4 jsou účinnější v porovnání s reaktivátory s oximovou skupinou v poloze C3. Na základě těchto znalostí bude zjišťováno, zdali 2-pyridinaldoximové monokvarterní soli (Obrázek 12) připravované v této práci jsou účinnější ve srovnání s podobnými monokvarterními sloučeninami s oximovou skupinu v poloze C4, které byly připraveny výzkumnou skupinou UHK (Obrázek 13) [32].



$n = 1; 2$

Obrázek 12: Struktura navržených monokvarterních amoniových solí.



$R_1 = \text{H}; \text{Cl}; \text{Br}; \text{F}$
 $R_2 = \text{H}; \text{Cl}; \text{Br}; \text{F}$

$n = 1; 2$

Obrázek 13: Struktura monokvarterních amoniových solí připravených výzkumnou skupinou UHK.

3 Cíle práce

Cílem práce bude šestikroková syntéza nových pyridinaldoximových monokvarterních solí jako potenciálních reaktivátorů BuChE. Prvním krokem přípravy finálního produktu bude Sonogashirova reakce, která vychází z methylesteru kyseliny 4-brombenzoové (**30**). Bude následovat katalytická hydrogenace, Appelova reakce, bazická hydrolyza esteru a tvorba amidu. Poslední dvě zmíněné reakce reagují mechanismem nukleofilní acylové substituce (S_NAc). Závěrečným krokem bude S_N2 reakce připravených amidů s 2-pyridinaldoximem za vzniku finálních produktů, monokvarterní amoniové soli **41** a **42** (Schéma 8). Připravené sloučeniny budou následně testovány *in vitro* na jejich schopnost reaktivovat hlavně inhibovanou BuChE, ale také bude testovaná jejich reaktivační schopnost u inhibované AChE.

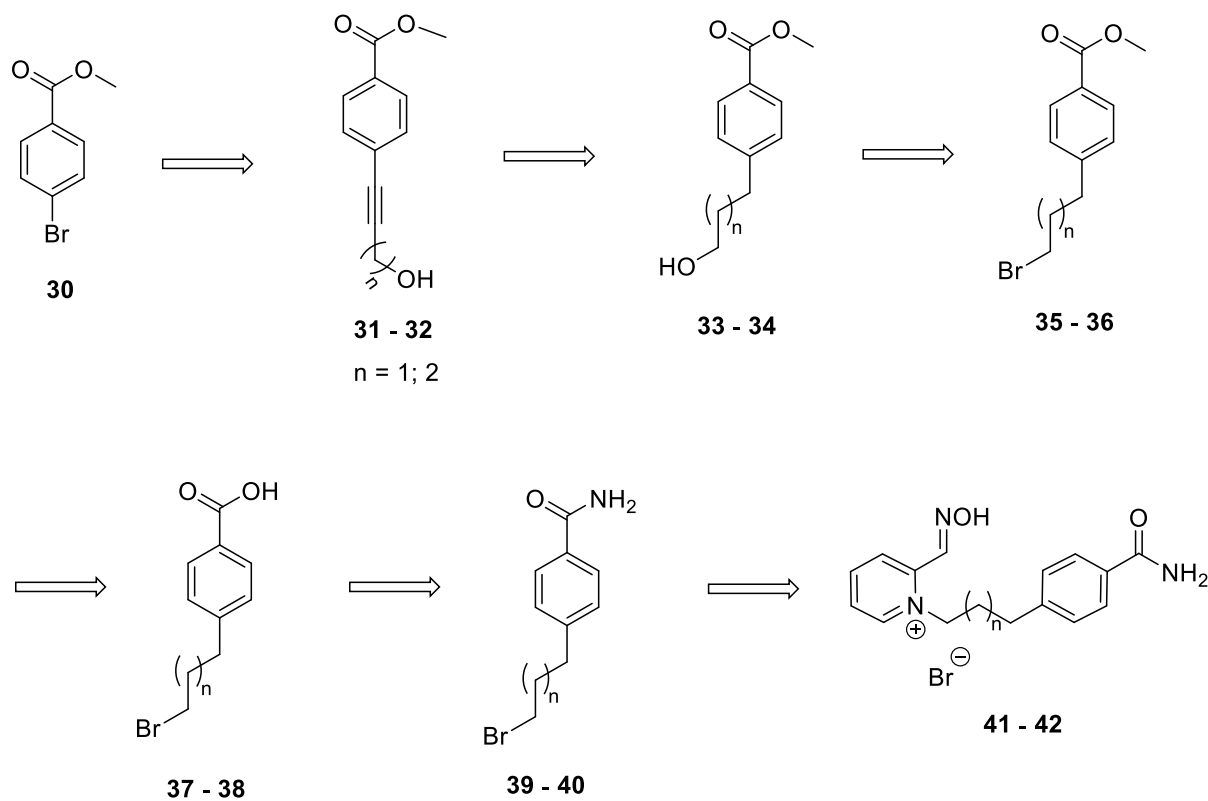


Schéma 8: Retrosyntetická analýza reakčních kroků při přípravě finálních produktů **41** a **42**.

4 Výsledky a diskuse

Prvním krokem syntézy byla reakce výchozí látky, methylesteru kyseliny 4-brombenzoové (**30**) s příslušným alkoholem **43** - **44** za vzniku látek **31** - **32** (Schéma 9). Výtěžek reakce pro **31** byl 64 % a 89 % pro **32**.

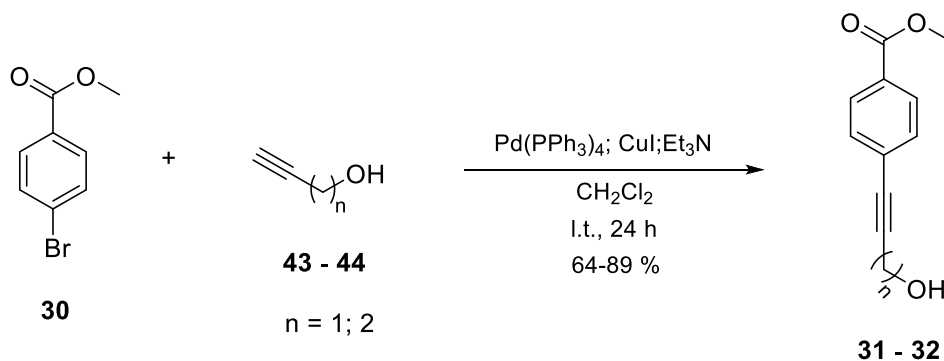


Schéma 9: Příprava sloučenin **31** a **32**.

Syntéza probíhá mechanismem Sonogashirovy reakce za přítomnosti $\text{Pd(PPh}_3)_4$ a CuI jako katalyzátoru. Sloučeniny Pd jsou citlivé na vzdušnou vlhkost, proto byl celý proces prováděn pod dusíkovou atmosférou, aby se zabránilo jeho oxidaci. Sonogashirova reakce se skládá z procesů jako je oxidativní adice, transmetalace, *trans/cis* izomerizace a redukční eliminace (Schéma 10).

$\text{Pd(PPh}_3)_4$ reaguje s výchozí látkou **30** za vzniku tetraedrického meziproductu v procesu zvaném oxidativní adice. V dalším kroku tento intermediát reaguje s (3-hydroxypropynyl)kuprátem, popř. (4-hydroxybutynyl)kuprátem transmetalací reakcí. Dojde k navázání 3-hydroxypropynylu popř. 4-hydroxypropynylu na atom paladia. Následnou *trans/cis* izomerizací a redukční eliminací vznikají produkty **31** a **32**. Čisté produkty byly izolovány pomocí sloupcové chromatografie. Struktura sloučenin byla ověřena metodami NMR a MS.

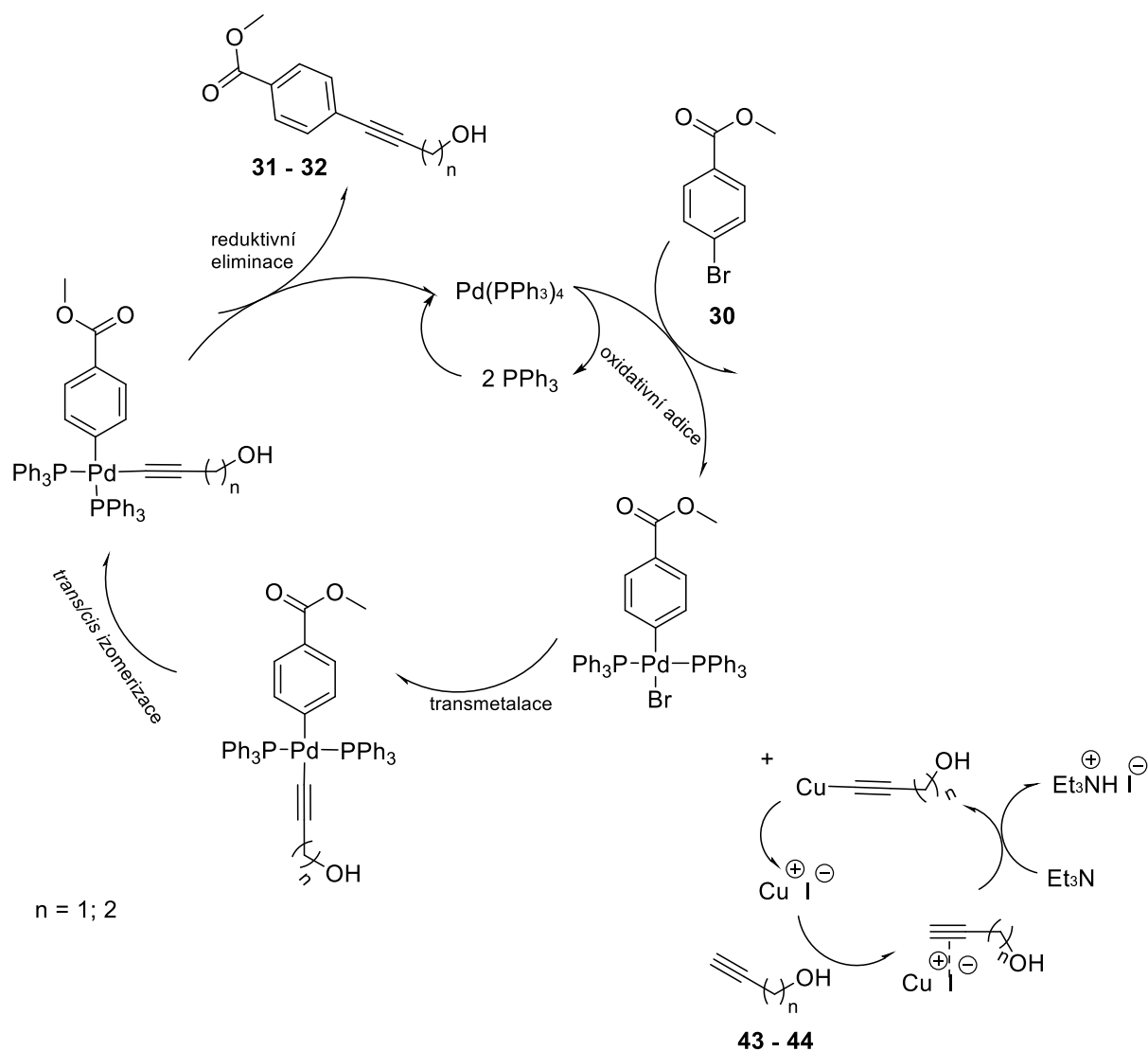


Schéma 10: Mechanismus Sonogashirovy reakce při přípravě sloučenin **31** a **32**.

Druhým krokem syntézy byla katalytická hydrogenace násobné vazby u látek **31** a **32** za přítomnosti katalyzátoru 5% Pd/C v rozpouštědlech ethylacetátu (EtOAc) a CH_3OH . Reakce probíhala ve vodíkové atmosféře (Schéma 11). Výsledné produkty byly přečištěny sloupcovou chromatografií a byly získány ve výtěžku 78 % pro **33** a 84 % pro **34**. Jejich struktury byly ověřeny pomocí NMR a MS analýzy.

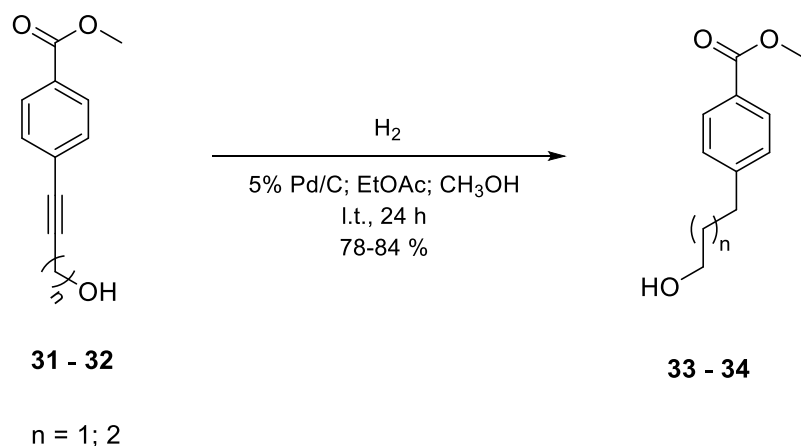


Schéma 11: Příprava sloučenin **33** a **34**.

Katalytická hydrogenace probíhá na povrchu 5% Pd/C jako *syn*-adice. V prvním kroku se molekulární vodík adsorbuje na povrchu katalyzátoru a disociuje se na atomární vodík. V druhém kroku se molekula s trojnou vazbou adsorbuje na povrchu Pd/C a vytvoří komplex s katalyzátorem. Poté dojde k přechodu atomu vodíku z kovu na atom uhlíku trojné vazby a následně tvorbě částečnému redukovanému intermediátu. Druhý atom vodíku přejde z kovu na druhý atom uhlíku trojné vazby za vzniku meziprojektu s dvojnou vazbou a obnovení katalyzátoru. Další katalytickou hydrogenací meziprojektu vzniká výsledný nasycený produkt **33** a **34**.

Třetím krokem syntézy byla tvorba sloučenin **35** a **36**. Reakce probíhala za přítomnosti CBr₄, Ph₃P v bezvodém CH₂Cl₂ jako rozpouštědle z výchozí látek **33** a **34** (Schéma 12). Produkty byly přečištěné pomocí sloupcové chromatografie a získány ve výtěžku 93 % pro **35** a 84 % pro **36**. Struktury byla ověřené metodami NMR a MS.

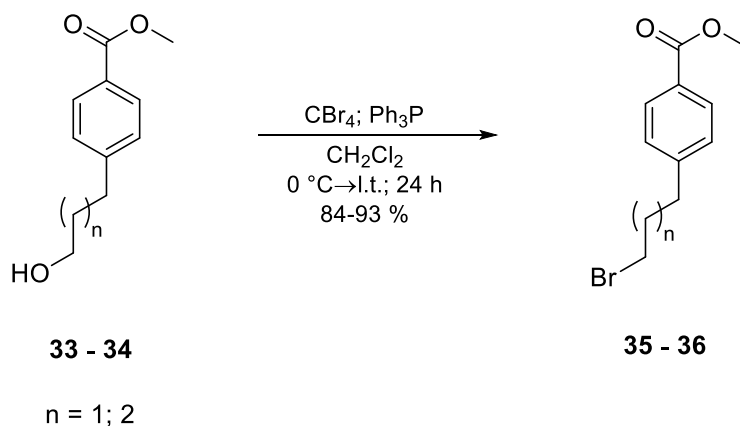


Schéma 12: Příprava sloučenin **35** a **36**.

Syntéza probíhá mechanismem Appelovy reakce, která využívá přítomnost silně elektrofilního halogenu pro podporu tvorby organického halogenidu z odpovídajícího alkoholu. Prvním krokem je reakce trifenylofosfinu (PPh_3) s CBr_4 za tvorby fosfoniové soli a karbaniontu, který v následujícím kroku vystupuje jako báze a vytrhne proton z hydroxylové skupiny výchozí látky **33** a **34**. Vzniklý intermediát atakuje atom fosforu ve fosfoniové soli za současného odtržení bromidového aniontu. V posledním kroku (mechanismus $\text{S}_{\text{N}}2$) se bromidový aniont naváže na atom uhlíku a odštěpí se trifenylofosfin oxid (Schéma 13).

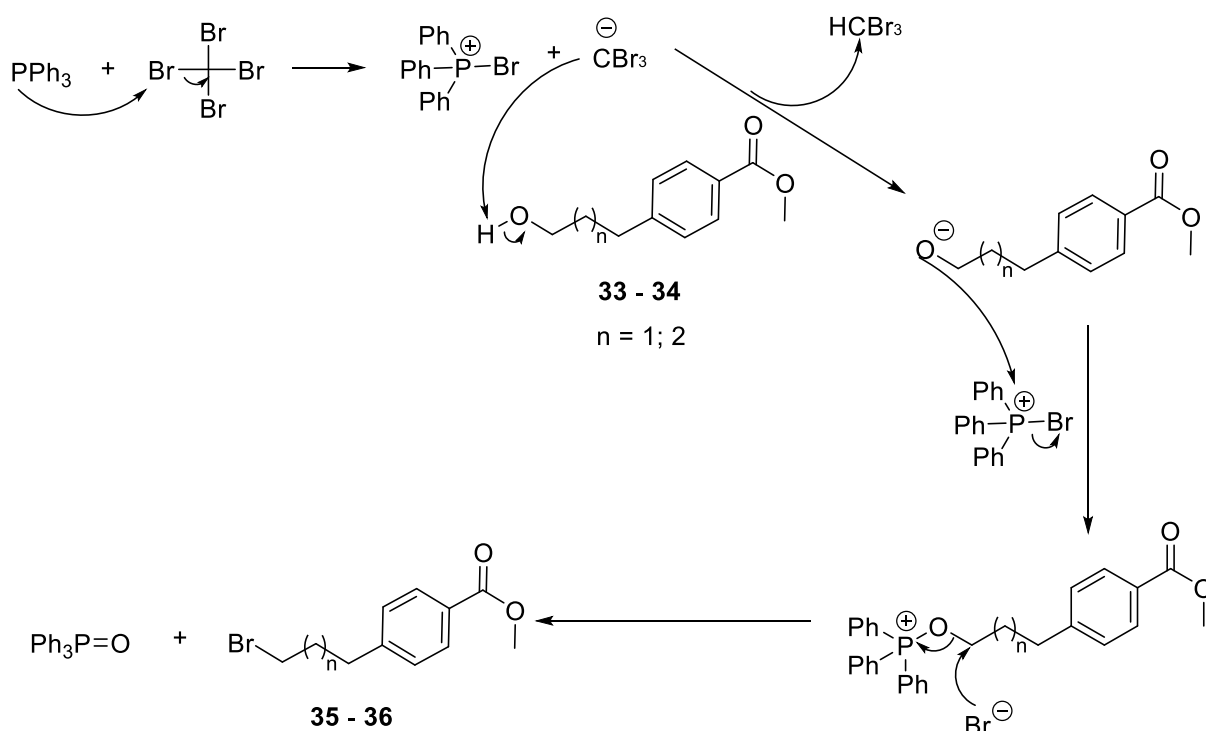


Schéma 13: Mechanismus Appelovy reakce při přípravě sloučenin **35** a **36**.

Dalším krokem syntézy byla hydrolyzáza esteru za vzniku karboxylové kyseliny. Výchozí látka **35** a **36** byla rozpuštěna v acetonu, po rozpuštění byl přidán vodní roztok NaOH . Reakce probíhala za l.t. po dobu 24 hodin (Schéma 14). Produkty byly izolovány ve formě bílé krystalické látky ve výtěžku 98 % pro **37** a 95 % pro **38**. Struktura obou sloučenin byla ověřena metodami NMR a MS.

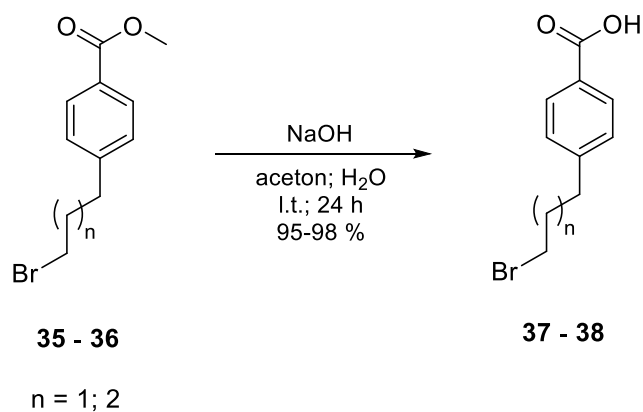


Schéma 14: Příprava produktů **37** a **38**.

Příprava karboxylové kyseliny z esteru probíhá mechanismem $\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$. Prvním krokem je nukleofilní atak hydroxidového aniontu na karbonylovou skupinu esteru. Následně dojde k odtržení alkoksidového iontu, který vzápětí odštěpí proton z karboxylové skupiny za vzniku karboxylátového iontu a alkoholu. Protonací karboxylátového iontu vznikají karboxylové kyseliny **37** a **38** (Schéma 15).

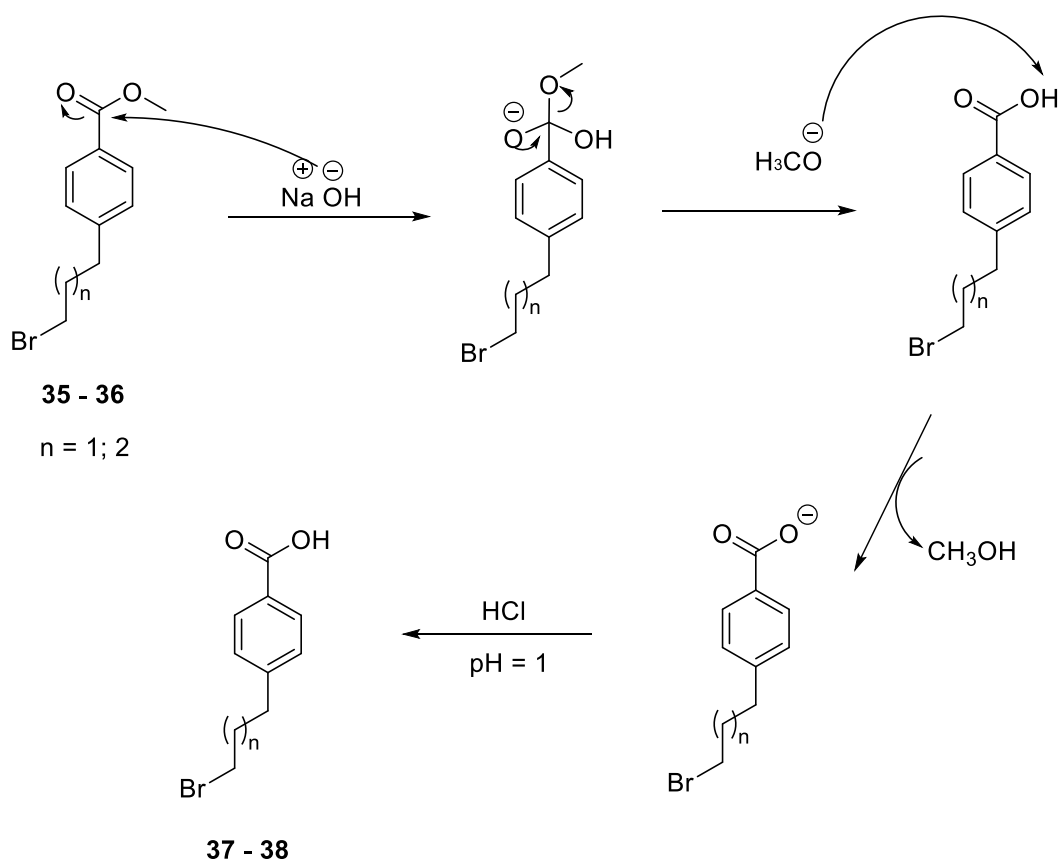


Schéma 15: Mechanismus bazicky katalyzované hydrolyzy esterů **37** a **38**.

Pátým krokem syntézy byla příprava amidu karboxylové kyseliny. Výchozí látka **37** a **38** byla rozpuštěna v suchém THF a ochlazena na 0 °C. Následně byl přidán Et₃N a ethylchlorformiát. Po rozpuštění všech komponent byl směsí probubláván plynný NH₃ (Schéma 16). Produkty byly získané precipitací ve formě bílé krystalické látky a ve výtěžku 69 % pro **39** a 64 % pro **40**. Struktura obou sloučenin byla ověřena metodami NMR a MS.

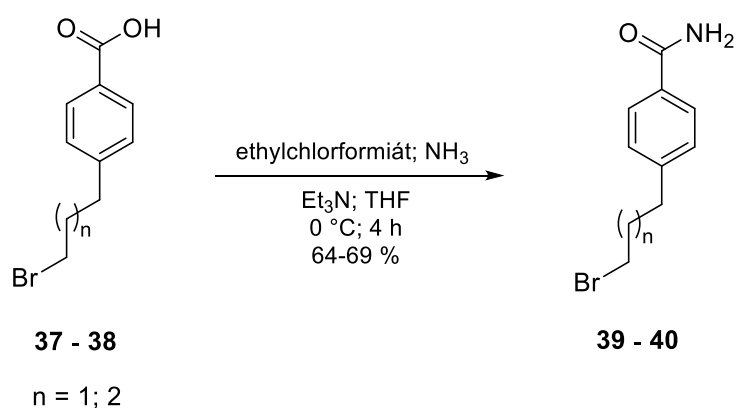


Schéma 16: Příprava produktů **39** a **40**.

Reakce probíhá mechanismem S_NAc. Hydroxyskupina je velmi špatně odstupující skupina, proto je potřeba ji převést pomocí ethylchlorformiátu na lehkou odstupující skupinu. V průběhu reakce vzniká smíšený anhydrid jako meziprodukt.

Prvním krokem je reakce ethylchlorformiátu s výchozí látkou **37** a **38** jako nukleofilním činidlem, za přítomnosti Et₃N jako báze. Vzniká tetraedrický meziprodukt, z kterého odstupuje chloridový aniont. Vytvořený smíšený anhydrid reaguje s molekulou NH₃ a dochází k tvorbě dalšího tetraedrického meziproduktu, z kterého se následně eliminuje EtOH a CO₂ a vznikají konečné produkty **39** a **40**, kterými jsou amidy karboxylových kyselin (Schéma 17).

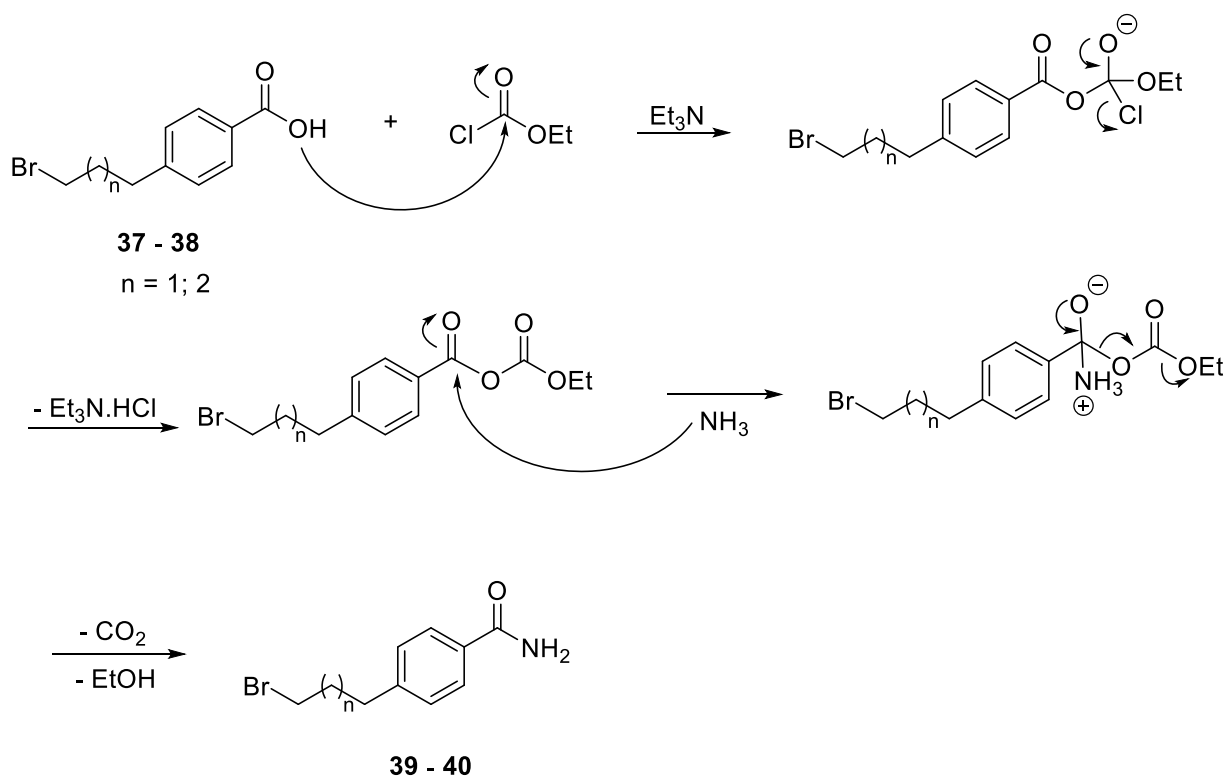


Schéma 17: Mechanismus tvorby amidů **39** a **40** pomocí S_NAc .

Posledním krokem syntézy sloučenin **41** a **42** byla reakce připravených amidů s aldoximem **21** S_N2 reakcí (Schéma 18). Výchozí látka **39** a **40** byla rozpuštěna v bezvodém CH_3CN . Po přidání aldoximu **21** byla směs refluxována. Finální produkt **41** byl izolován ve formě tmavě zelené amorfnní látky ve výtěžku 24 % a produkt **42** ve formě tmavě zelené olejovité látky ve výtěžku 23 %. Struktura obou sloučenin byla ověřena metodami NMR a MS. HPLC čistota (UV; $\lambda = 254$ nm) finálních produktů **41** a **42** byla ≥ 95 %.

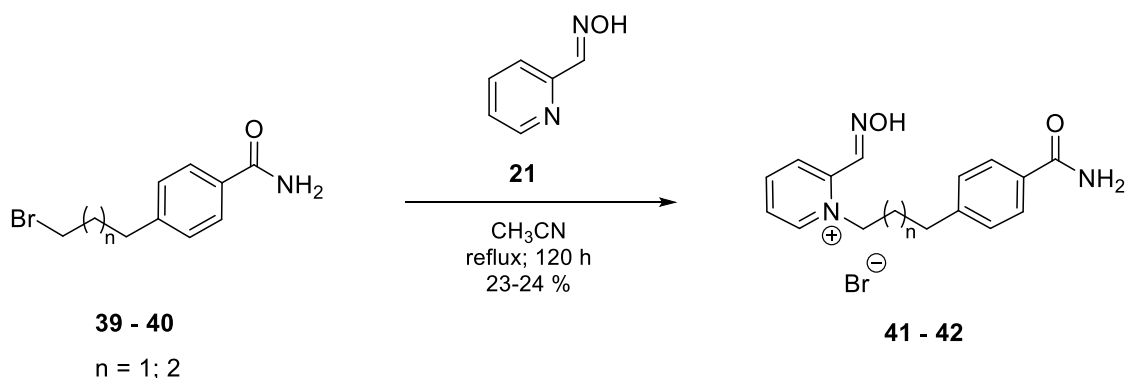


Schéma 18: Příprava 2-pyridinaldoximových monokvarterních soli **41** a **42**.

Atom dusíku v pyridinovém skeletu aldoximu **21** má nukleofilní charakter a je schopen atakovat atom uhlíku, který je připojen na atom bromu v alifatickém řetězci sloučenin **39** a **40**. Atak na tento uhlík probíhá díky polarizaci vazby: atom uhlíku má parciální kladný náboj a atom bromu nese parciální záporný náboj. Atom dusíku atakuje atom uhlíku z opačné strany než odstupuje bromidový aniont. Dochází k tvorbě přechodového stavu, kdy je atom uhlíku současně vázán na atom dusíku a atom bromu (Schéma 19).

Reakce probíhá v prostředí CH_3CN , jakožto polárního aprotického rozpouštědla, které snižuje aktivační energii reakce tím, že není schopné stabilizovat a tím snížit reaktivitu nukleofilního činidla, jako to je v případě protických rozpouštědel.

Nízká výtěžnost v tomto reakčním kroku je pravděpodobně způsobena elektronovými a sterickými efekty aldoximové skupiny v poloze C2 na pyridinovém skeletu při $\text{S}_{\text{N}}2$ reakci.

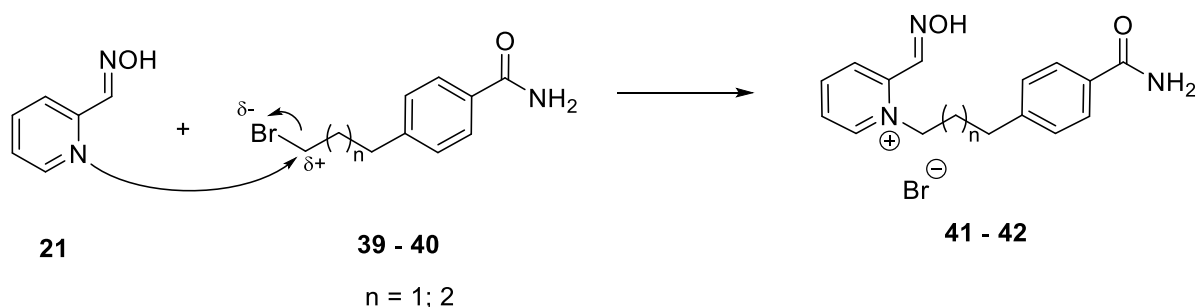


Schéma 19: Mechanismus tvorby finálních produktů **41** a **42** $\text{S}_{\text{N}}2$ reakcí.

Celkový výtěžek finálního produktu **41** je 8 % a výtěžek produktu **42** je 9 %. V porovnání se syntézou monokvarterních solí, které byly připraveny výzkumnou skupinou UHK [32] bylo skutečně výhodnější ve druhém kroku nejdříve provést katalytickou hydrogenaci, a poté Appelovu reakci. Ve zmíněné práci byl jako katalyzátor použit $\text{Pd}(\text{OH})_2$, který působí jako báze a dochází k odštěpení HBr , tzn. mimo hlavní produkt vzniká také vedlejší produkt eliminace [32].

Přehled všech reakčních kroků je znázorněn na Schématu 20.

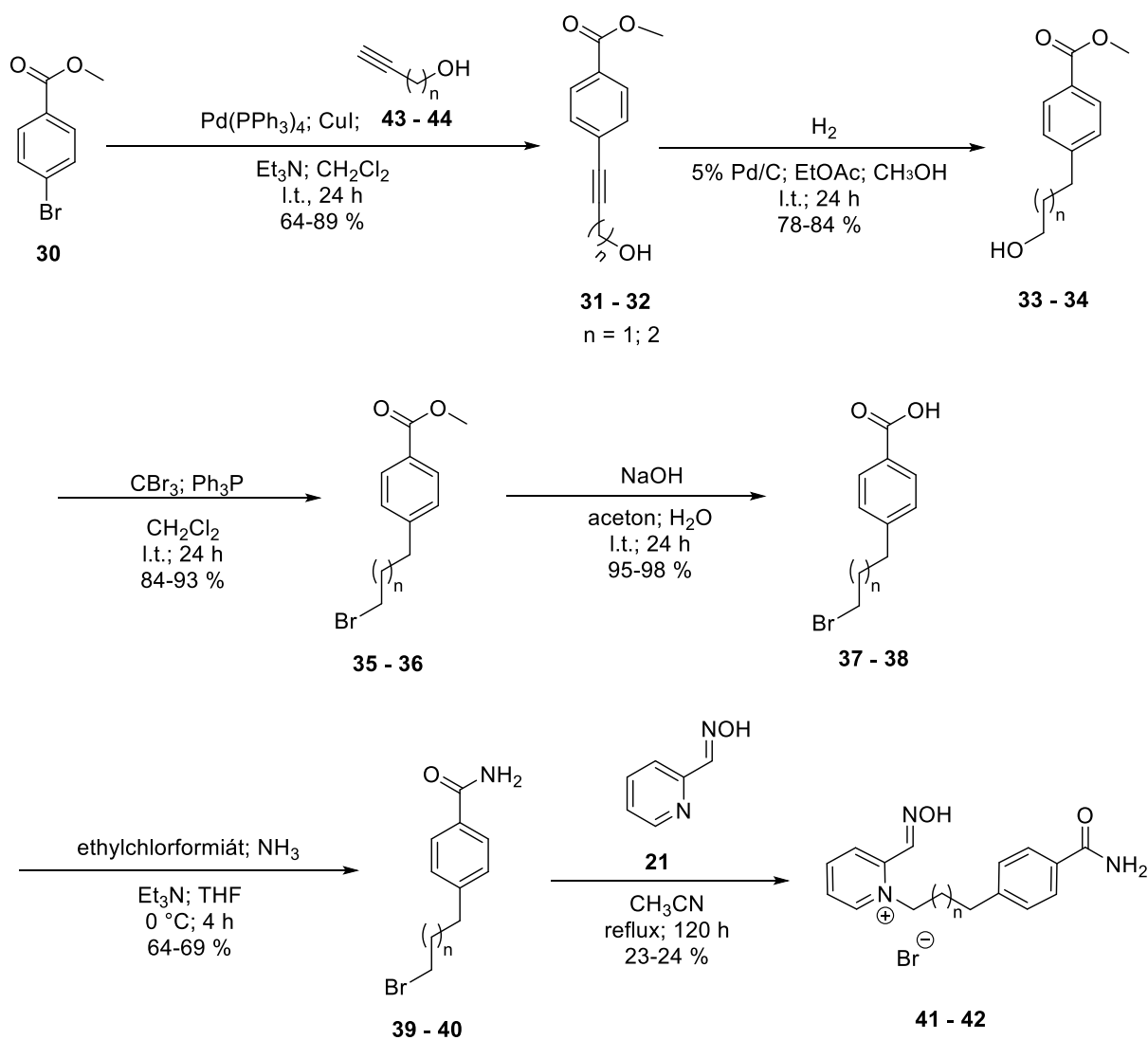


Schéma 20: Přehled všech reakčních kroků při přípravě finálních produktů **41** a **42**.

5 Experimentální část

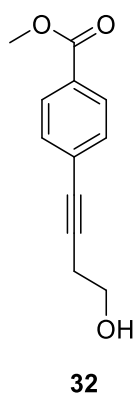
Všechny chemikálie, které byly v syntéze využity, byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a VWR International (Česká republika). Průběh reakcí byl kontrolován pomocí TLC za použití TLC destiček Merck Silica gel 60 F₂₅₄ (Sigma-Aldrich, Česká republika) (mobilní fáze heptan/ethylacetát v poměru 1/1, 5/1, 1/2, 95/5, 2/1 a 9/1, DCM/MeOH v poměru 10/1, DCM/MeOH/NH₃ v poměru 9/1/ 2%). Detekce TLC byla prováděna při vlnové délce 254 nm pod UV lampou (CAMAG, VWR International, Česká republika). Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-545 (Donau Lab, Česká republika) bez korekce.

Připravené sloučeniny byly analyzovány pomocí ¹H a ¹³C NMR spekter, které byly měřeny v deuteriovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*₆) při laboratorní teplotě na FT NMR spektrometru Varian S500 (499,87 MHz pro ¹H a 125,71 MHz pro ¹³C) (Varian Comp. Palo Alto, USA) a Bruker Ascend™ 500 (499,87 MHz pro ¹H a 125,71 MHz pro ¹³C) (Bruker, Německo). Chemické posuny (δ) jsou uvedeny v jednotkách ppm. V ¹H spektrech jsou chemické posuny vztaženy k centrálnímu signálu DMSO-*d*₆ (δ = 2,50 ppm) a v ¹³C spektrech k centrálnímu signálu DMSO-*d*₆ (δ = 39,43 ppm). Interakční konstanty (*J*) jsou uvedeny v jednotkách Hz. Spinová multiplicita je značena znaky br s (broad singlet), s (singlet), d (dublet), t (triplet) nebo m (multiplet).

Hmotnostní spektra byla změřena pomocí elektrosprejové ionizace (MS/ESI) a selekcí iontu skrz trojitý kvadrupól na přístroji Agilent 6470 a vyhodnocena prostřednictvím programu MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

5.1 Příprava monokvarterních amoniových solí s čtyřuhlíkatým řetězcem

Methylester kyseliny 4-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)benzoové



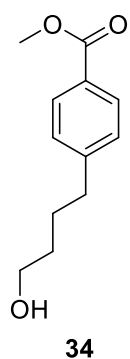
Výchozí látka, methylester kyseliny 4-brombenzoové (**30**) (7,00 g; 32,55 mmol), byla pod dusíkovou atmosférou rozpuštěna v bezvodém CH_2Cl_2 (340 ml). Poté byl přidán Et_3N (175 ml) a but-3-yn-1-ol (**43**) (2,28 g; 32,55 mmol; 1 ekv). Směs byla po dobu 30 min probublávána dusíkem. Následně byl přidán CuI (0,62 g; 3,26 mmol; 0,1 ekv) a $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1,88 g; 1,63 mmol; 0,05 ekv). Reakční směs byla míchána po dobu 24 hodin při l.t. Průběh reakce byl kontrolován pomocí metody TLC. Po ukončení bylo odpařeno rozpouštědlo a směs přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (heptan/ EtOAc ; 2/1). Produkt byl izolován ve formě žluté krystalické látky s výtěžkem 5,92 g (89 %). $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$. $M = 204,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. $T_t = 94,5 - 96,4 \text{ }^\circ\text{C}$; lit. [33] $95,0 - 97,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2,59 (t; $J = 6,8 \text{ Hz}$; 2H; CH_2); 3,58 – 3,62 (m; 2H; CH_2); 3,84 (s; 3H; CH_3); 4,94 (t, $J = 5,6 \text{ Hz}$; 1H; OH); 7,51 (d; $J = 8,2 \text{ Hz}$; 2H; 2 x ArH); 7,91 (d; $J = 8,2 \text{ Hz}$; 2H; 2 x ArH) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 23,3; 52,1; 59,5; 80,3; 92,3; 128,0; 128,5; 129,2; 131,5; 165,6 ppm.

MS (ESI^+): $[\text{M}^+]$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_3^+$ (m/z): 205,1; experimentální hodnota: 205,1.

Methylester kyseliny 4-(4-hydroxybutyl)benzoové



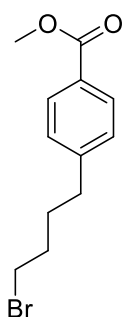
Ve dvouhrdlé baňce byla v methanolu (140 ml) pod dusíkovou atmosférou rozpuštěna výchozí látka **32** (1,00 g; 4,90 mmol). Následně byl přidán EtOAc (70 ml). Ke směsi bylo přidáno 5% Pd/C (1,36 g; 0,64 mmol; 0,13 ekv). Reakční směs byla míchána pod vodíkovou atmosférou 24 hodin při l.t., a poté přefiltrována přes celit. Průběh reakce byl kontrolován pomocí metody TLC. Rozpouštědlo bylo odpařeno a směs byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (heptan/ EtOAc ; 5/1; 1/2). Produkt byl izolován ve formě nažloutlé olejovité kapaliny ve výtěžku 0,86 g (84 %). $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$. $M = 208,26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,40 – 1,45 (m; 2H; CH₂); 1,58 – 1,64 (m; 2H; CH₂); 2,64 (t; *J* = 7,7 Hz; 2H; CH₂); 3,38 – 3,42 (m; 2H; CH₂); 3,83 (s; 3H; CH₃); 4,38 (t; *J* = 5,2 Hz; 1H; OH); 7,33 (d; *J* = 8,1 Hz; 2H; 2 x ArH); 7,87 (d; *J* = 8,1 Hz; 2H; 2 x ArH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 26,0; 31,9; 34,8; 51,9; 60,3; 127,0; 128,6; 129,1; 148,2; 168,1 ppm.

MS (ESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₁₂H₁₇O₃⁺ (m/z): 209,1; experimentální hodnota: 209,1.

Methylester kyseliny 4-(4-brombutyl)benzoové



36

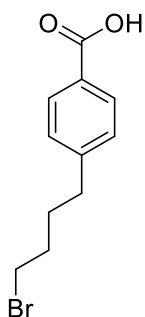
K výchozí látce **34** (0,82 g; 3,93 mmol) byl přidán bezvodý CH₂Cl₂ (15 ml), po ochlazení směsi na 0 °C byl přidán CBr₄ (1,69 g; 5,11 mmol; 1,3 ekv). Do druhé baňky byl navážen Ph₃P (1,44 g; 5,51 mmol; 1,4 ekv), který byl rozpuštěn v bezvodém CH₂Cl₂ (14 ml). Látky v baňkách byly spojeny a míchány po dobu 30 minut při teplotě 0 °C. Po 30 min byla směs ohřáta na l.t., při které byla míchána 24 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí metody TLC. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno a směs byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (heptan/EtOAc; 95/5). Produkt byl izolován ve formě bezbarvé olejovité kapaliny ve výtěžku 0,9 g (84 %). C₁₂H₁₅BrO₂. M = 271,15 g·mol⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,67 – 1,73 (m; 2H; CH₂); 1,78 – 1,83 (m; 2H; CH₂); 2,68 (t; *J* = 7,6 Hz; 2H; CH₂); 3,55 (t; *J* = 6,6 Hz; 2H; CH₂); 3,83 (s; 3H; CH₃); 7,35 (d; *J* = 8,1 Hz; 2H; 2 x ArH); 7,88 (d; *J* = 8,2 Hz; 2H; 2 x ArH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 28,9; 31,6; 34,0; 34,7; 51,9; 127,2; 128,6; 129,2; 147,6; 166,1 ppm.

MS (ESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₁₂H₁₆BrO₂⁺ (m/z): 271,0; experimentální hodnota: 271,0.

Kyselina 4-(4-brombutyl)benzoová



38

Výchozí látka **36** (2,30 g; 8,48 mmol) byla rozpuštěna v acetonu (17 ml). V druhé baňce byl rozpuštěn NaOH (0,58 g; 14,42 mmol; 1,7 ekv) ve vodě (7,2 ml). Po rozpuštění obou látek byl obsah smíchán. Směs byla míchána při l. t. po dobu 24 hodin. Průběh reakce byl kontrolován metodou TLC. Po 24 hodinách byl odpařen aceton, přidána voda (18,4 ml) a směs byla okyselena 6M HCl na pH = 1, která byla následně přefiltrována a promyta vodou. Poté byl vzniklý produkt rozpuštěn v diethyletheru a po precipitaci bylo rozpouštědlo odpařeno. Výsledný produkt

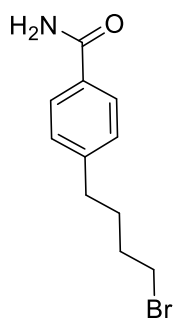
byl získán ve formě bílé krystalické látky ve výtěžku 2,08 g (95 %). $C_{11}H_{13}BrO_2$. $M = 257,13$ $g \cdot mol^{-1}$. $T_f = 134,8 - 136,7$ °C.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,68 – 1,73 (m; 2H; CH_2); 1,78 – 1,84 (m; 2H; CH_2); 2,67 (t; $J = 7,6$ Hz; 2H; CH_2); 3,55 (t; $J = 6,6$ Hz; 2H; CH_2); 7,32 (d; $J = 8,1$ Hz; 2H; 2 x ArH); 7,86 (d; $J = 8,2$ Hz; 2H; 2 x ArH); 12,78 (s; 1H; COOH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 28,9; 31,6; 33,9; 34,7; 128,3; 128,4; 129,3; 147,1; 167,2 ppm.

MS (ESI $^-$): $[M^-]$: vypočítaná hodnota pro $C_{11}H_{12}BrO_2^-$ (m/z): 255,0; experimentální hodnota: 255,0.

Amid kyseliny 4-(4-brombutyl)benzoové



Kyselina 4-(4-brombutyl)benzoová (**38**) (2,00 g; 7,88 mmol) byla rozpuštěna v suchém THF (34 ml). Směs byla ochlazena na 0 °C. Pod dusíkovou atmosférou byl přidán Et_3N (1,05 ml). V průběhu jedné hodiny byl postupně přikapáván ethylchlorformiát (0,85 ml). Reakční směs byla míchána 1 hodinu při 0 °C, a poté byl přidán suchý THF (17 ml). Následně byla směs 75 minut probublávána amoniakem. Průběh reakce byl kontrolován pomocí metody TLC.

Po ukončení reakce byla směs zfiltrována a promyta THF. Po odpaření THF byl přidán heptan a směs byla po dobu 90 minut refluxována. Poté byl produkt přefiltrován a dosušen. Produkt byl izolován ve formě bílé pevné látky a získán ve výtěžku 1,29 g (64 %). $C_{11}H_{14}BrNO$. $M = 256,14$ $g \cdot mol^{-1}$. $T_f = 127,3 - 129,3$ °C.

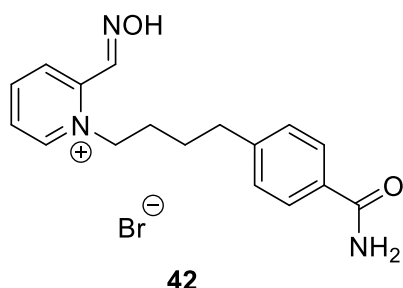
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,68 – 1,74 (m; 2H; CH_2); 1,76 – 1,82 (m; 2H; CH_2); 2,65 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H; CH_2); 3,56 (t; $J = 6,6$ Hz; 2H; CH_2); 7,26 – 7,29 (m; 3H; 2 x ArH a NH); 7,80 (d; $J = 8,1$ Hz; 2H; 2 x ArH); 7,89 (br s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 28,9; 31,6; 34,0; 34,7; 127,2; 128,6; 129,2; 147,6; 166,6 ppm.

MS (ESI $^+$): $[M^+]$: vypočítaná hodnota pro $C_{11}H_{15}BrNO^+$ (m/z): 256,0; experimentální hodnota: 256,1.

Příprava finální monokvarterní amoniové soli

1-(4-(4-karbamoylfenyl)butyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromid



Výchozí látka **40** (0,14 g; 0,55 mmol) byla rozpuštěna v bezvodém CH₃CN (4,6 ml). Následně byl přidán aldoxim **21** (0,10 g; 0,82 mmol; 1,5 ekv). Směs byla 120 hodin refluxována v dusíkové atmosféře. Průběh reakce byl kontrolován pomocí metody TLC. Po ukončení reakce byl odpařen CH₃CN, přidán aceton (30 ml) a směs byla 30 minut

precipitovaná za refluxu. Po dekantaci byl produkt dosušen. Produkt byl izolován ve formě tmavě zelené olejovité látky ve výtěžku 0,07 g (23 %). C₁₇H₂₀BrN₃O₂. M = 378,27 g·mol⁻¹.

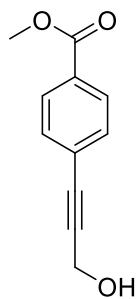
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,63 – 1,68 (m; 2H; CH₂); 1,81 – 1,85 (m; 2H; CH₂); 2,65 – 2,68 (m; 2H; CH₂); 4,76 (t; *J* = 7,5 Hz; 2H; CH₂); 7,28 – 7,31 (m; 3H; 2 x ArH + NH); 7,79 (d; *J* = 8,2 Hz; 2H; 2 x ArH); 7,89 (s; 1H; NH); 8,08 – 8,10 (m; 1H; ArH); 8,39 (d; *J* = 8,2 Hz; 1H; ArH); 8,52 – 8,55 (m; 1H; ArH); 8,80 (s; 1H; CH); 9,03 (d; *J* = 6,2 Hz; 1H; ArH); 13,16 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 26,9; 29,9; 34,1; 57,6; 125,8; 127,4; 127,5; 128,0; 131,9; 141,4; 144,9; 145,1; 145,8; 146,7; 167,7 ppm.

MS (ESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₁₇H₂₀N₃O₂⁺ (m/z): 298,2; experimentální hodnota: 298,2.

5.2 Příprava monokvarterních amoniových solí s trojúhíkatým řetězcem

Methylester kyseliny 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoové



31

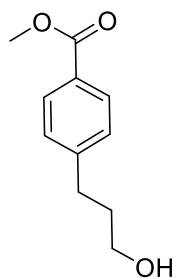
Výchozí látka, methylester kyseliny 4-brombenzoové (**30**) (7,00 g; 32,55 mmol), byla pod dusíkovou atmosférou rozpuštěna v bezvodém CH_2Cl_2 (340 ml). Poté byl přidán Et_3N (175 ml) a prop-2-yn-1-ol (**44**) (1,83 g; 32,55 mmol; 1 ekv). Směs byla po dobu 30 min probublávána dusíkem. Následně byl přidán CuI (0,62 g; 3,26 mmol; 0,1 ekv) a $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1,88 g; 1,63 mmol; 0,05 ekv). Reakční směs byla míchána po dobu 24 hodin při l.t. Průběh reakce byl kontrolován pomocí metody TLC. Po ukončení bylo odpařeno rozpouštědlo a směs přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (heptan/ EtOAc ; 2/1). Produkt byl izolován ve formě žluté krystalické látky s výtěžkem 3,96 g (64 %). $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$. $M = 190,20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. $T_f = 81,3 - 83,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 3,86 (s; 3H; CH_3); 4,34 (d; $J = 6,0 \text{ Hz}$; 2H; CH_2); 5,40 (t; $J = 5,6 \text{ Hz}$; 1H; OH); 7,55 (d; $J = 8,3 \text{ Hz}$; 2H; 2 x ArH); 7,93 (d; $J = 8,2 \text{ Hz}$; 2H; 2 x ArH) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 49,3; 52,2; 82,7; 93,1; 127,1; 129,0; 129,3; 131,4; 165,5 ppm.

MS (ESI^+): $[\text{M}^+]$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_3^+$ (m/z): 191,1; experimentální hodnota: 191,2.

Methylester kyseliny 4-(3-hydroxypropyl) benzoové



33

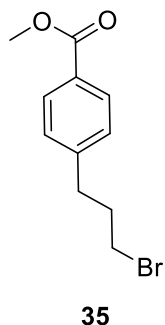
Ve dvouhrdlé baňce byla v methanolu (182 ml) pod dusíkovou atmosférou rozpuštěna výchozí látka **31** (1,30 g; 6,83 mmol). Následně byl přidán EtOAc (91 ml). Ke směsi bylo přidáno 5% Pd/C (1,89 g; 0,89 mmol; 0,13 ekv). Reakční směs byla míchána pod vodíkovou atmosférou 24 hodin při l.t., a poté přefiltrována přes celit. Rozpouštědlo bylo odpařeno a směs byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (heptan/ EtOAc ; 5/1, 1/2). Produkt byl izolován ve formě nažloutlé olejovité kapaliny ve výtěžku 1,05 g (78 %). $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$. $M = 194,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1,70 – 1,75 (m; 2H; CH_2); 2,66 – 2,70 (m; 2H; CH_2); 3,39 – 3,42 (m; 2H; CH_2); 3,83 (s; 3H; CH_3); 4,51 (t; $J = 5,1 \text{ Hz}$; 1H; OH); 7,34 (d; $J = 8,2 \text{ Hz}$; 2H; 2 x ArH); 7,87 (d; $J = 8,2 \text{ Hz}$; 2H; 2 x ArH) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 31,6; 33,8; 51,9; 59,9; 127,0; 128,6; 129,1; 148,1; 166,1 ppm.

MS (ESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₁₁H₁₅O₃⁺ (m/z): 195,1; experimentální hodnota: 195,2.

Methylester kyseliny 4-(3-brompropyl)benzoové



K výchozí látce **33** (1,53 g; 7,88 mmol) byl přidán bezvodý CH₂Cl₂ (29 ml), po ochlazení směsi na 0 °C byl přidán CBr₄ (3,40 g; 10,24 mmol; 1,3 ekv). Do druhé baňky byl navážen Ph₃P (2,89 g; 11,03 mmol; 1,4 eq) a byl přidán bezvodý CH₂Cl₂ (29 ml). Obsah baněk byl spojen a míchán po dobu 30 minut při 0 °C. Po 30 min byla směs ohřáta na l.t., při které byla míchána 24 hodin. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno a směs byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (heptan/EtOAc; 95/5). Izolovaný produkt byl získán ve formě bílé pevné látky

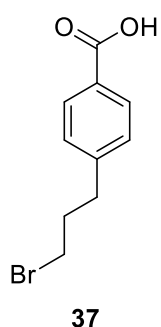
ve výtěžku 1,89 g (93 %). C₁₁H₁₃BrO₂. M = 257,13 g·mol⁻¹. T_t = 31,9 – 33,9 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,09 – 2,15 (m; 2H; CH₂); 2,77 – 2,80 (m; 2H; CH₂); 3,51 (t; *J* = 6,6 Hz; 2H; CH₂); 3,84 (s; 3H; CH₃); 7,37 (d; *J* = 8,2 Hz; 2H; 2 x ArH); 7,89 (d; *J* = 8,3 Hz; 2H; 2 x ArH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 33,3; 34,1; 51,9; 127,4; 128,7; 129,2; 146,4; 166,0 ppm.

MS (ESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₁₁H₁₄BrO₂⁺ (m/z): 257,0; experimentální hodnota: 257,1.

Kyselina 4-(4-brompropyl)benzoová



Výchozí látka **35** (0,85 g; 3,31 mmol) byla rozpuštěna v acetonu (6,4 ml). V druhé baňce byl rozpuštěn NaOH (0,22 g; 5,62 mmol; 1,7 ekv) ve vodě (2,7 ml). Po rozpuštění obou látek byl obsah smíchán. Směs byla míchána při l. t. po dobu 24 hodin. Průběh reakce byl kontrolován metodou TLC. Po 24 hodinách byl odpařen aceton, přidána voda (6,8 ml) a směs byla okyselena 6M HCl na pH = 1, která byla následně přefiltrována a promyta vodou. Poté byl vzniklý produkt rozpuštěn v diethyletheru a po precipitaci bylo rozpouštědlo odpařeno.

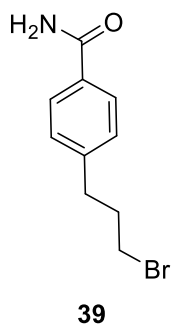
Výsledný produkt byl získán ve formě bílé krystalické látky ve výtěžku 0,79 g (98 %). C₁₀H₁₁BrO₂. M = 243,10 g·mol⁻¹. T_t = 121,8 – 123,8 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,09 – 2,14 (m; 2H; CH₂); 2,76 – 2,79 (m; 2H; CH₂); 3,51 (t; *J* = 6,6 Hz; 2H; CH₂); 7,34 (d; *J* = 8,2 Hz; 2H; 2 x ArH); 7,87 (d; *J* = 8,2 Hz; 2H; 2 x ArH); 12,84 (s; 1H; COOH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 33,3; 33,4; 34,1; 128,5; 128,6; 129,4; 145,8; 167,1 ppm.

MS (ESI⁻): [M⁻]: vypočítaná hodnota pro C₁₀H₁₀BrO₂⁻ (m/z): 241,0; experimentální hodnota: 240,9.

Amid kyseliny 4-(4-brompropyl)benzoové



Kyselina 4-(4-brompropyl)benzoová (**37**) (0,70 g; 2,88 mmol) byla rozpuštěna v suchém THF (12,6 ml). Směs byla ochlazena na 0 °C. Pod dusíkovou atmosférou byl přidán Et₃N (0,38 ml). V průběhu jedné hodiny byl postupně přikapáván ethylchlorformiát (0,31 ml). Reakční směs byla míchána 1 hodinu při 0 °C, a poté byl přidán suchý THF (6,3 ml). Následně byla směs 75 minut probublávána amoniakem. Průběh reakce byl kontrolován pomocí metody TLC.

Po ukončení reakce byla směs zfiltrována a promyta THF. Po odpaření THF byl přidán heptan a směs byla po dobu 90 minut refluxována. Poté byl produkt přefiltrován a dosušen. Produkt byl izolován ve formě bílé pevné látky ve výtěžku 0,48 g (69 %). C₁₀H₁₂BrNO. M = 242,12 g·mol⁻¹. T_f = 142,4 – 144,4 °C.

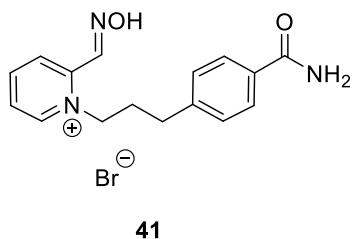
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,07 – 2,13 (m; 2H; CH₂); 2,75 – 2,78 (m; 2H; CH₂); 3,51 (t; *J* = 6,6 Hz; 2H; CH₂); 7,28 – 7,30 (m; 3H; 2 x ArH a NH); 7,82 (d; *J* = 8,1 Hz; 2H; 2 x ArH); 7,89 (br s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 33,1; 33,4; 34,0; 127,2; 128,6; 132,2; 143,6; 167,6 ppm.

MS (ESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₁₀H₁₃BrNO⁺ (m/z): 242,0; experimentální hodnota: 242,1.

Příprava finální monokvarterní amoniové soli

1-(3-(4-karbamoylfenyl)propyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromid



Výchozí látka **39** (0,14 g; 0,56 mmol) byla rozpuštěna v bezvodém CH₃CN (4,6 ml). Následně byl přidán aldoxim **21** (0,10 g; 0,82 mmol; 1,5 ekv). Směs byla 120 hodin refluxována v dusíkové atmosféře. Průběh reakce byl kontrolován pomocí metody TLC. Po ukončení reakce byl odpařen CH₃CN, přidán aceton (30 ml) a směs byla 30 minut precipitovaná za refluxu. Po

dekantací byl produkt dosušen. Dosušený produkt byl izolován ve formě tmavě zelené amorfni látky ve výtěžku 0,07 g (24 %). C₁₆H₁₈BrN₃O₂. M = 364,24 g·mol⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,14 – 2,17 (m; 2H; CH₂); 2,75 – 2,78 (m; 2H; CH₂); 4,76 – 4,79 (m; 2H; CH₂); 7,28 – 7,31 (m; 3H; 2 x ArH + NH); 7,81 (d; *J* = 8,2 Hz; 2H; 2 x ArH); 7,90 (s; 1H; NH); 8,07 – 8,10 (m; 1H; ArH); 8,39 (d; *J* = 8,2 Hz; 1H; ArH); 8,52 – 8,55 (m; 1H; ArH); 8,77 (s; 1H; CH); 9,07 (d; *J* = 6,2 Hz; 1H; ArH); 13,14 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 31,2; 31,4; 57,6; 125,8; 127,4; 127,6; 128,0; 132,1; 141,4; 143,7; 145,1; 145,9; 146,8; 167,5 ppm.

MS (ESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₁₆H₁₈N₃O₂⁺ (m/z): 284,1; experimentální hodnota: 284,1.

Závěr

V teoretické části bakalářské práce popisují působení neurotransmiteru ACh, jakým způsobem dochází k přenosu elektrického potenciálu, strukturu, funkci AChE a BuChE, a jakým způsobem mohou být tyto enzymy inhibovány organofosfáty. Dále zmiňují mechanismus reaktivace cholinesteras, strukturu a účinky významných reaktivátorů. U reaktivátoru asoximu (HI-6; **20**) popisují také dva z možných způsobů přípravy.

V experimentální části připravují dvě řady finálních produktů, s trojúhíkatým spojovacím řetězcem **41** a se čtyřhíkatým spojovacím řetězcem **42**. Připravené sloučeniny mají oximovou skupinu navázanou v poloze C2 na jednom z pyridinových skeletu.

V porovnání s přípravou monokvarterních solí výzkumné skupiny UHK [32] byla ve druhém kroku syntézy nejdříve provedena hydrogenace, a až poté Appelova reakce. Tento krok se ukázal jako velmi efektivní s poměrně vysokým výtěžkem (78 % u produktu **33** s trojúhíkatým spojovacím řetězcem, 84 % u produktu **34** se čtyřhíkatým spojovacím řetězcem). Zároveň nevznikal vedlejší produkt eliminace, jako to bylo v případě přípravy výzkumné skupiny UHK. To je také pravděpodobně způsobeno volbou katalyzátoru. V předchozí práci byl použit Pd(OH)₂, který působí jako báze a dochází k eliminaci HBr.

Po šesti krocích syntézy byl celkový výtěžek finálního produktu **41** s trojúhíkatým spojovacím řetězcem 8 % a produktu **42** se čtyřhíkatým spojovacím řetězcem 9 %. Nízká výtěžnost v posledním reakčním kroku je pravděpodobně způsobena elektronovými a sterickými efekty aldoximové skupiny v poloze C2 na pyridinovém skeletu při S_N2 reakci.

Hlavní cíl práce, syntéza 2-pyridinaldoximových monokvarterních solí, byl splněn. Struktura všech připravených sloučenin byla analyzována metodou NMR a MS. U pevných látek byly stanoveny teploty tání.

Finální produkty budou testovány *in vitro*, jestli jsou schopné inhibovanou BuChE reaktivovat a zároveň se bude zjišťovat, zdali oximová skupina v poloze C2 je účinnější, než oximová skupina v poloze C4 v již podobně připravených reaktivátorech [32]. Současně se bude testovat schopnost interakce postranního arylalkylového řetězce s PAS BuChE prostřednictvím π -kation interakcí nebo π - π interakcí. Vedle toho bude testována schopnost připravených sloučenin reaktivovat AChE, které by měly mít oproti biskvarterním solím lepší prostupnost přes HEB.

Použitá literatura

- [1] MARRAZZA G., Piezoelectric Biosensors for Organophosphate and Carbamate Pesticides: A Review. *Biosensors*. **2014**, 4 (3), s. 301–317.
- [2] ŽDÁROVÁ KARASOVÁ J. Toxické účinky pesticidů. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. **2017**, 80/113 (2), s. 164–171.
- [3] SOUČEK M., SVAČINA P. *Vnitřní lékařství v kostce*. Praha: Grada Publishing, **2019**. ISBN 978-80-271-2289-9.
- [4] *Vražda bojovou látkou. Kim Čong-nama zabil nervový plyn VX. Česká televize*. [online]. [cit. 2020-06-23]. Dostupné z: <https://ct24.ceskatelevize.cz/svet/2043418-vrazda-bojovou-latkou-kim-cong-nama-zabil-nervovy-plyn-vx>.
- [5] „Případ Skripalových: doktoři jim nedávali velké šance na zotavení, útok novičokem ale přežili“. *iROZHLAS*. [online]. [cit. 2020-06-23]. Dostupné z: https://www.irozhlas.cz/zpravy-svet/sergej-skripal-salisbury-novicok-anglie-rusko_1901010801_dp.
- [6] PATOČKA J., *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada, **2004**. ISBN 80-247-0608-3..
- [7] DRUGA R., GRIM M., DUBOVÝ P. *Anatomie centrálního nervového systému*. Praha: Galén, **2011**. ISBN 978-80-7262-706-6.
- [8] MAĎA P., FONTANA J. *Funkce buněk a lidského těla*. [multimediální skripta]. [online]. [cit. 2020-02-07]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/regulacni-mechanismy-2-nervova-regulace/5-neurotransmisni-systemy/>.
- [9] LOCKRIDGE O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology and Therapeutics*. **2015**, 148, s. 34–46.
- [10] PATOČKA J., KUČA K., JUN D.; Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Králové)*, **2004**, 47, s. 215–228.
- [11] GORECKI L., KORABECNY J., MUSILEK K. a další. SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Archives of Toxicology*, **2016**, 90 (12), s. 2831–2859.
- [12] SILBERNAGL S., DESPOPOULOS A. Atlas fyziologie člověka: překlad 8. německého vydání. 4. české vydání. Praha: Grada Publishing, **2016**. ISBN 978-80-247-4271-7.
- [13] ZORBAZ T., MALINAK D., KUČA K. a další. Butyrylcholinesterase inhibited by nerve agents is efficiently reactivated with chlorinated pyridinium oximes. *Chemico-Biological Interactions*, **2019**, 307, s. 16–20.

- [14] EGELKROUT E. Production of the bioscavenger butyrylcholinesterase in maize. *Molecular Breeding*. **2017**, 37 (11), s. 136.
- [15] *Genetika - Biologie: mutace*. [online]. [cit. 2020-02-08]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/mutace>.
- [16] DELACOUR H., DEDOME E., COURCELLE S. a další. Butyrylcholinesterase deficiency., *Annals de Biologie Clinique (Paris)*, **2016**, 74 (3), s. 279–285.
- [17] ÇOKUĞRAŞ A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance, *Turkish Journal of Biochemistry*. **2003**, 28 (2), s. 54-61.
- [18] KUČA K., JUNA D., MUSILEK K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. **2006**, 16 (10), s. 269–277.
- [19] WILSON I. B., GINSBURG S. A powerful reactivator of alkylphosphateinhibited acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1955**, (18), s. 168-170.
- [20] GUPTA R. C., *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*, Second edition. Boston: Elsevier/AP. **2015**. ISBN 9780128001592.
- [21] MALINAK D., KORABECNY J., SOUKUP O. a další. A Review of the Synthesis of Quaternary Acetylcholinesterase Reactivators. *Current Organic Chemistry*. **2018**, 22 (16), s. 1619-1648.
- [22] SOUKUP O., TOBIN G., KUMAR U. K. a další. Interaction of nerve agent antidotes with cholinergic systems. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, 17 (16), s. 1708-1718.
- [23] KASSA J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **2002**, 40 (6), s. 803-816.
- [24] JOKANOVIC M., MAKSIMOVIC M. A comparison of trimedoxime, obidoxime, pralidoxime and HI-6 in the treatment of oral organophosphorus insecticide poisoning in the rat. *Arch. Toxicol*, **1995**, 70 (2), s. 119-123.
- [25] INNS R. H., LEADBEATER L. The efficacy of bispyridinium derivatives in the treatment of organophosphonate poisoning in the Guinea pig. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1983**, 35 (7), s. 427-433.
- [26] HAMILTON M. G., LUNDY P. M. HI-6 therapy of soman and tabun poisoning in primates and rodents. *Arch. Toxicol.*, **1989**, 63 (2), s. 144-149.
- [27] HEILBRONN E., TOLAGEN B. Toxogonin in sarin, soman and tabun poisoning. *Biochem. Pharmacol.*, **1965**, 14 (1), s. 73-77.
- [28] MAKSIMOVIC M., KOVACEVIC V., BINENFELD Z. Protective and reactivating effects of HI-6-toxogonin mixture in rats and guinea-pigs poisoned by nerve agents. *Acta Pharm. Jugosl.*, **1989**, (39), s. 27-33.

- [29] EYER P., HAGEDORN I., LADSTETTER B. Study on the stability of the oxime HI 6 in aqueous solution. *Arch. Toxicol.*, **1988**, 62 (2), s. 224-226.
- [30] HSIAO L. Y. Y., MUSALLAM H. A. Bis-Methylene Ether Pyridinium Compound Preparation. World Patent WO 92/17450. **1992**.
- [31] HUANG D.-S., GETTYS G. R., DAPREMONT O. a další. Process for Halomethyl Ethers of Hydroxyiminomethyl Quaternary Pyridinium Salts. U.S. Patent US 2006/0183777 A1. **2006**.
- [32] NEUGEBAUEROVÁ M., *Příprava nových halogen-4-pyridinaldoximových monokvarterních reaktivátorů butyrylcholinesterasy*. Hradec Králové, **2019**. Diplomová práce, Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta, katedra chemie.
- [33] TAYLOR E. C., HARRINGTON M. P. A convergent synthesis of 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid and 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrohomofolic acid. An effective principle for carbonyl group activation. *The Journal of Organic Chemistry*. **1990**, s. 3222–3227.