

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Sandro Makarić i Sara Morasi Piperčić

**PRIPRAVA OKSIMA IMIDAZOLA I
MONOSAHARIDA TE NJIHOVE INTERAKCIJE S
BUTIRILKOLINESTERAZAMA**

Zagreb, 2012.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Srđanke Tomić - Pisarović te neposrednim vodstvom Krešimira Baumanna, prof. biol. i kem. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011./2012.

POPIS KRATICA

AChE - acetilkolinesteraza

BChE - butirilkolinesteraza

*Hu*BChE - butirilkolinesteraza iz ljudskog seruma

*RS*BChE - butirilkolinesteraza iz seruma kunića

*Eq*BChE - liofilizirana butirilkolinesteraza iz seruma konja

ACh - acetilkolin

ATCh - acetiltiokolin

Ch - kolin

OP - organofosforni spojevi

n-BuLi - *n*-butil-litij

DTNB - 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina)

TNB anion - 5-tio-2-nitrobenzoatni anion

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. ACETILKOLINESTERAZA.....	2
2.1.1. STRUKTURA I AKTIVNO MJESTO AChE	3
2.1.2. MEHANIZAM HIDROLIZE KATALIZIRANE AChE.....	4
2.2. BUTIRILKOLINESTERAZA	6
2.3. ORGANOFOSFORNI SPOJEVI	7
2.3.1. MEHANIZAM INHIBICIJE AChE ORGANOFOSFORNIM SPOJEVIMA	8
2.4. OKSIMI KAO ANTIDOTI.....	9
2.5. ANTIDOTSKA AKTIVNOST DERIVATA IMIDAZOLA	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. OPĆE NAPOMENE.....	16
3.2. PRIPRAVA SPOJEVA	17
3.2.1. PRIPRAVA <i>N</i> -METILIMIDAZOL-2-KARBALDEHIDA	17
3.2.2. PRIPRAVA 2-HIDROKSIIMINOMETIL-1-METILIMIDAZOLA	18
3.2.3. PRIPRAVA 2-HIDROKSIIMINOMETIL- <i>N,N</i> -DIMETILIMIDAZOLIJEVOG JODIDA	18
3.2.4. PRIPRAVA BENZILNIH DERIVATA 2-HIDROKSIIMINOMETIL-3- METILIMIDAZOLIJEVIH BROMIDA.....	19
3.2.5. PRIPRAVA D-FRUKTOZA-OKSIMA	21
3.2.6. PRIPRAVA D-RIBOZA-OKSIMA	22
3.3. ENZIMSKA KINETIKA.....	23
3.3.1. MJERENJE AKTIVNOSTI ENZIMA	23
3.3.2. MJERENJE REVERZIBILNE INHIBICIJE.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. PRIPRAVA SPOJEVA	25

4.1.1. <i>N</i> -METILIMIDAZOL-2-KARBALDEHID	25
4.1.2. 2-HIDROKSIIMINOMETIL-1-METILIMIDAZOL.....	27
4.1.3. KVATERNI DERIVATI IMIDAZOL-2-ALDOKSIMA.....	28
4.1.4. OKSIMI D-FRUKTOZE I D-RIBOZE	29
4.2. INTERAKCIJA OKSIMA S BUTIRILKOLINESTERAZOM IZ LJUDSKOG SERUMA	30
4.3. INTERAKCIJA OKSIMA S BUTIRILKOLINESTERAZOM IZ SERUMA KUNIĆA	32
4.4. INTERAKCIJA OKSIMA S BUTIRILKOLINESTERAZOM IZ SERUMA KONJA	33
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA.....	36
SAŽETAK	40
ABSTRACT	41
ŽIVOTOPISI	42
DODATCI	44

1. UVOD

Acetilkinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7.) i butirilkolinesteraza (BChE, E.C. 3.1.1.8.) su enzimi koji su dio grupe serinskih esteraza. AChE hidrolizira acetilkolin (ACh) i povezana je s prijenosom živčanih impulsa te ju redovito nalazimo u sinapsama dok BChE, poznata kao i plazma kolinesteraza ili pseudokolinesteraza, hidrolizira butirilkolin, sintetizira se u jetri i nalazi se u većoj količini u plazmi.¹

Neki organofosforni spojevi (OP spojevi), kao naprimjer sarin, tabun, soman i dr., inhibiraju AChE i BChE što dovodi do nakupljanja ACh u sinapsama te izaziva razne fiziološke promjene, a moguće i smrt. OP spojevi se koriste kao insekticidi, pesticidi i bojni otrovi te je potraga za univerzalnim antidotom i danas aktualna iz razloga što još uvijek nije pronađen antidot koji bi djelovao na širok spektar toksičnih OP spojeva.²

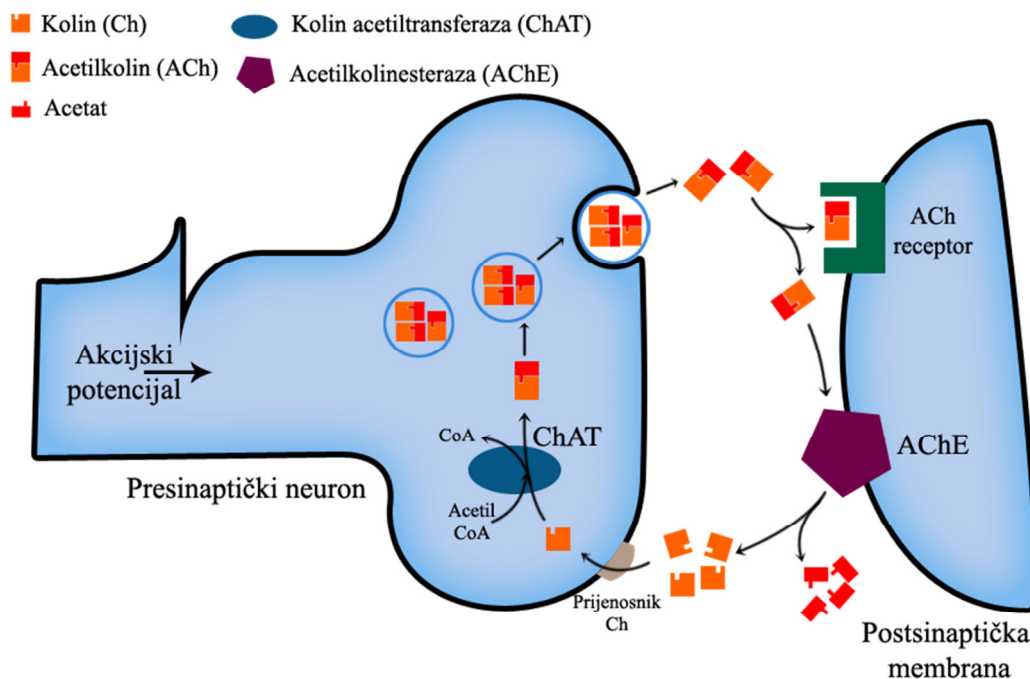
Inhibicija AChE se smatra primarnim uzrokom trovanja OP spojevima. Terapeutske strategije su usmjerene prema zaustavljanju prekomjerne stimulacije receptora, terapiji atropinom i reaktivaciji inhibirane AChE oksimima (R-CH=NOH). Reaktivacija je bitna unutar živčano-mišićne sinapse, gdje je atropin neučinkovit, budući da vanjska blokada živčano-mišićne sinapse vodi do prestanka rada respiratornog sustava. Pacijentima otrovanim OP spojevima se treba što brže postaviti dijagnoza.³

Danas su u kliničkoj primjeni samo četiri piridinijeva oksima koji se koriste u kombinaciji s atropinom. Glavni nedostatak svih oksima je slab prijelaz barijere krv-mozak.^{4,5}

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 ACETILKOLINESTERAZA

Acetilkinesteraza se ubraja u skupinu esteraza, podskupinu hidrolaza i podpodskupinu hidrolaza karboksilnih kiselina.² AChE možemo naći u živčanim i glija stanicama ljudskog mozga.⁶ Njena fiziološka uloga je hidroliza transmitera acetilkolina (ACh) tijekom prijenosa živčanih impulsa (slika 1.), a može se objasniti u nekoliko koraka. Prvo se ACh otpušta iz presinaptičkog živca u sinaptičku pukotinu zbog akcijskog potencijala koji prolazi stanicom. Potom ACh difundira kroz sinapsu te se veže na ACh receptor (koji kontrolira ulazak K^+ iona u postsinaptički živac ili mišićnu stanicu). Tako se stvara akcijski potencijal u postsinaptičkoj stanici. Tada AChE brzo hidrolizira ACh i prekida živčani impuls.⁷



Slika 1. Shematski prikaz prijenosa živčanog impulsa s presinaptičkog neurona na postsinaptičku membranu; ACh se sintetizira u presinaptičkom neuronu pomoću kolin acetiltransferaze (ChAT); acetilkolinesteraza (AChE) hidrolizira ACh u kolinergičkoj sinapsi.⁷

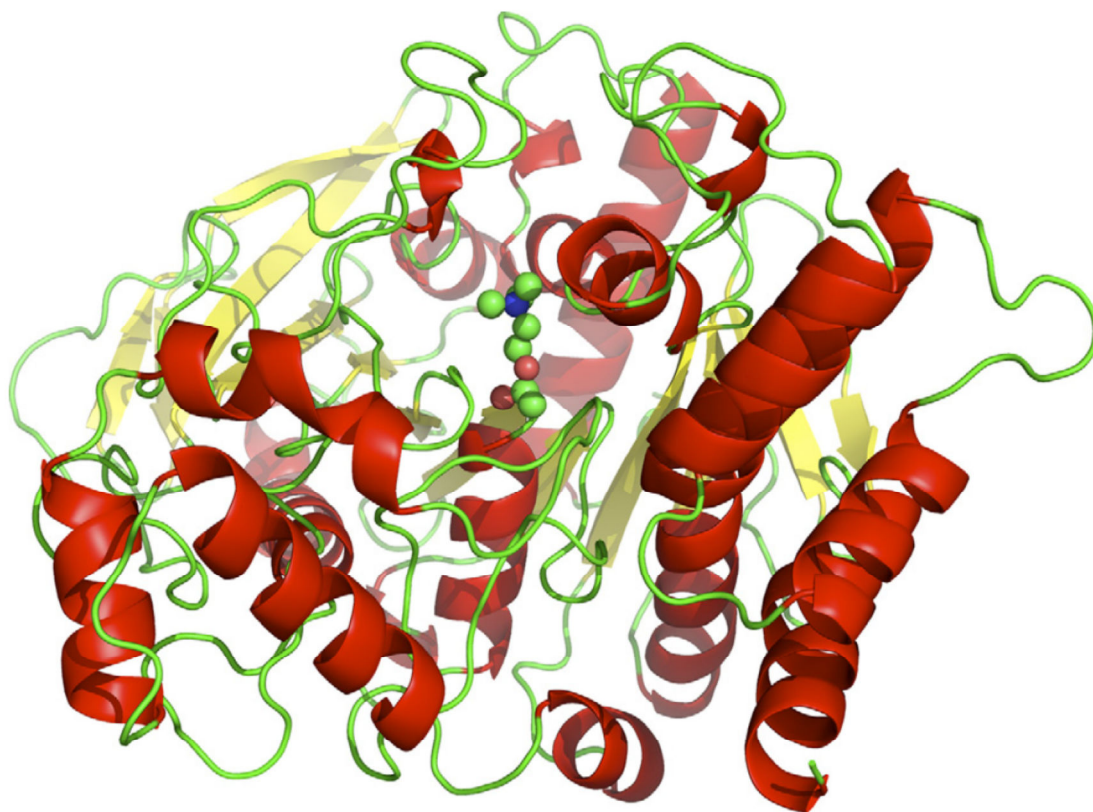
AChE spada u najefikasnije enzime iz skupine serinskih hidrolaza - brzina hidrolize supstrata joj je bliska brzinama difuzijski kontroliranih reakcija. ACh-om posredovani prijenosi živčanih impulsa su od životne važnosti jer je iznenadan prekid ovog procesa smrtonosan, a promjene vode do kvarenja kognitivnih i neuromišićnih funkcija, kao npr. u slučaju Alzheimerove bolesti. AChE nije samo enzim koji sudjeluje u kolinergičnom živčanom sustavu nego ima i ulogu u drugim biološkim procesima kao što su neuritogeneza, adhezija i diferencijacija stanica te nastajanje amiloidnih vlakana.⁸

2.1.1. STRUKTURA I AKTIVNO MJESTO AChE

Prva molekulska struktura AChE je riješena rendgenskom strukturnom analizom čime je potvrđeno da je ovaj enzim serinska hidrolaza.^{9,11} AChE je polimorfni enzim, vezan na membrane stanica preko kolagenske uzvojnice, sastavljen od globularnih katalitičkih podjedinica, svaki mase 70-80 kDa. Te podjedinice se grupiraju u oligomerne strukture koje se dijele na dvije klase: globularne strukture (sastavljene od monomera, dimera ili tetramera) i asimetrične strukture (koje se dijele u tri posebne grupe: katalitičke, kolagenske i nekolagenske podjedinice).^{7,9}

Prva riješena trodimenzionalna struktura AChE (*Torpedo californica*, TcAChE) je otkrila da se katalitička trijada, slična onima u drugim serinskim hidrolazama i proteazama, sastoji od sljedećih aminokiselina: Ser200, His440 i Glu327.¹² U TcAChE, katalitička trijada se nalazi na dnu 20 Å dubokog i uskog ždrijela.¹²⁻¹⁴ AChE ima stalni dipol koji je paralelan s osi aktivnog mjesta ždrijela što rezultira efikasnim navođenjem pozitivno nabijenog supstrata kroz ždrijelo.¹⁵ Ovo elektrostatsko navođenje supstrata, koje je rezultat velikog dipolnog momenta samog enzima, doprinosi velikoj katalitičkoj učinkovitosti.^{12,13}

AChE je alosterički enzim što je dokazano kinetičkim istraživanjima.⁹ Na alosteričku stranu se vežu određeni supstrati, reverzibilni inhibitori i organofosforni spojevi.¹⁶ Kada je ligand vezan na perifernu stranu, on može sprječavati ulazak supstrata u ždrijelo te može promijeniti konformaciju samog aktivnog mjesta. U visokoj koncentraciji sam ACh inhibira, alosteričkim mehanizmom, AChE tako što se veže na periferno mjesto i time mijenja konformaciju aktivnog mjesta te sprječava vezanje u aktivni centar i hidrolizu.⁹

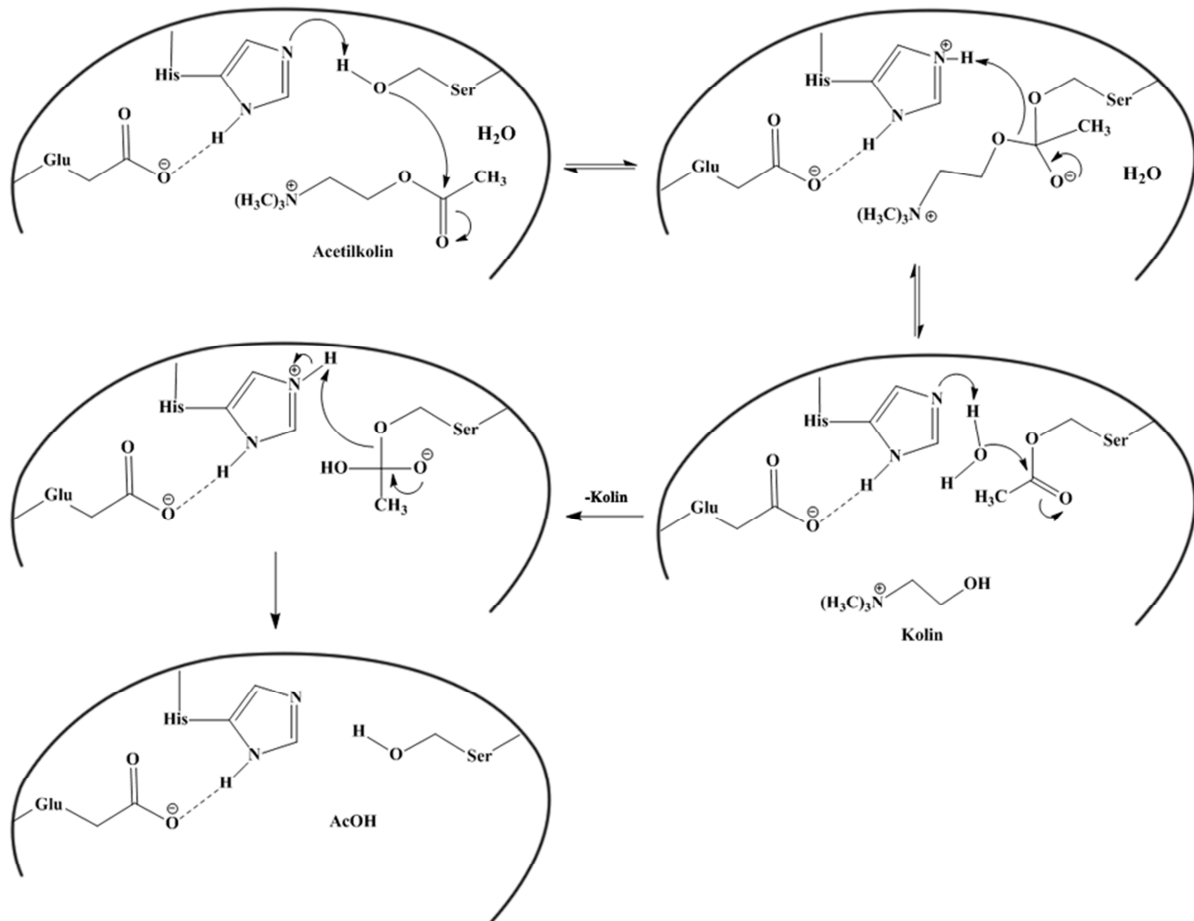


Slika 2. Struktura *TcAChE* s ACh vezanim u aktivnom mjestu.¹⁷

2.1.2. MEHANIZAM HIDROLIZE KATALIZIRANE AChE

Mehanizam hidrolize katalizirane AChE je baziran na stvaranju tetraedarskog acil-enzim međuprodukta, te kiselo-baznim reakcijama.¹ Mehanizam slijedi klasični Michealis-Menteničin model koji vrijedi za neutralne supstrate ili pozitivno nabijene supstrate u niskim koncentracijama, dok za ostale treba primijeniti drugačiji model.¹⁸ Jedan od modela uzima u obzir mogućnosti aktivacije ili inhibicije supstratom.

Zbog visoke katalitičke konstante koja premašuje iznos od 10^4 s^{-1} , AChE ubrajamo u najaktivnije enzime, gdje je difuzija ACh do aktivnog mjesta korak koji određuje brzinu reakcije. AChE ne katalizira samo hidrolizu ACh nego i druge supstrate kao što su: neki arilni esteri, anilidi, tioesteri, selenoesteri te drugi aciklički i *N*-demetilirani spojevi analogni ACh.⁷



Slika 3. Mehanizam hidrolize ACh u aktivnom mjestu AChE.

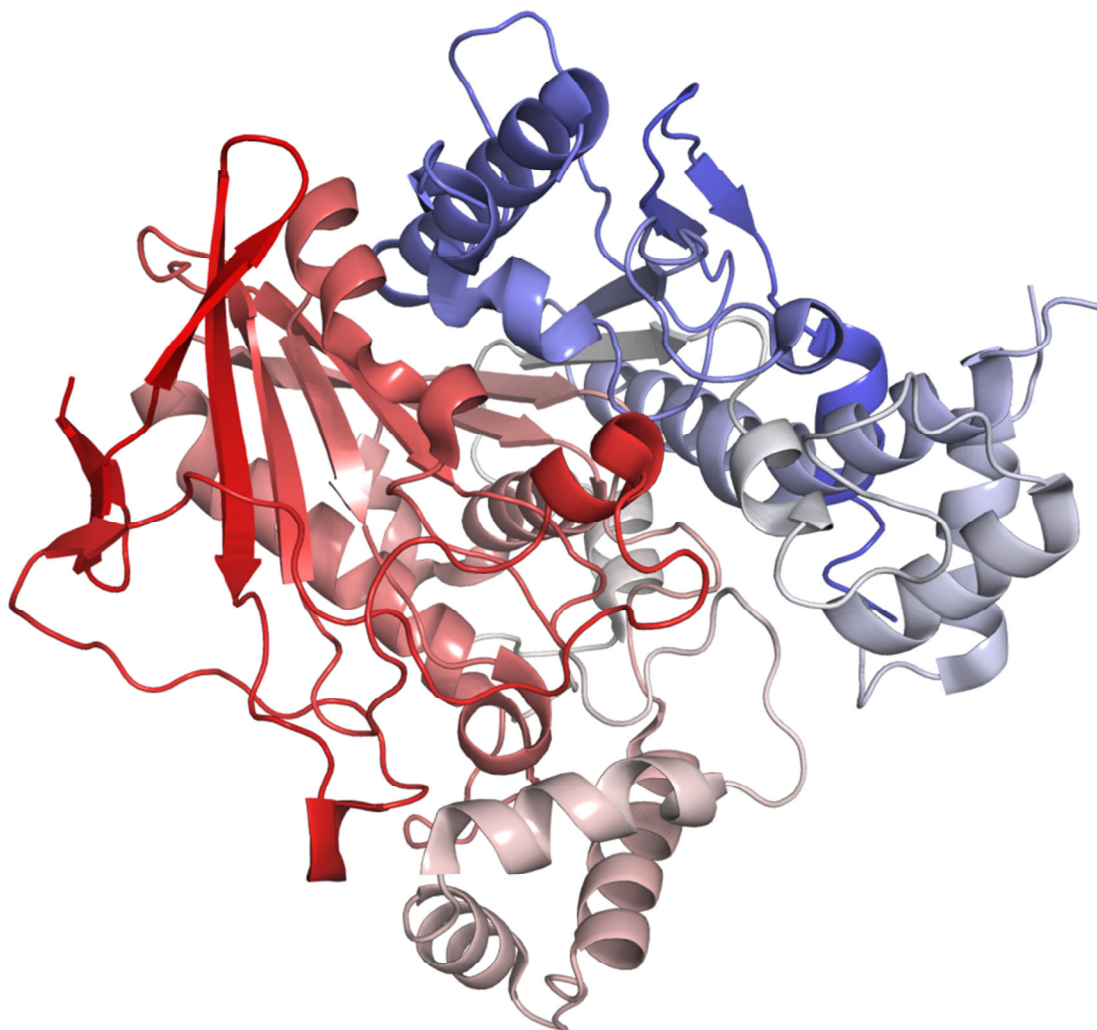
Predloženi mehanizam se sastoji od dva nukleofilna napada i dva prijenosa protona, s kovalentnim acil-enzim međuproduktom (slika 3.). U *TcAChE*, His440 uzima proton Ser200 čime on postaje nukleofil Ser-O⁻ te napada molekulu ACh tvoreći tetraedarski međuprodukt. Protonirani His440 je stabiliziran s Glu327. His440 ima veliku pokretljivost tijekom katalitičke reakcije AChE te je njegov točan položaj važan za ostvarivanje optimalne katalitičke aktivnosti. Taj je položaj održan steričkom smetnjom Phe288 i π - π interakcijom s Phe331.¹⁹ Donori vodikovih veza stabiliziraju acil-enzim međuprodukt pri acetilaciji i deacetilaciji. Gly118 i Gly119 tvore oksoanionsku šupljinu gdje se negativno nabijen kisikov atom smješta te ju stabilizira bez velikih konformacijskih promjena.^{12,14,20}

2.2. BUTIRILKOLINESTERAZA

AChE i BChE se razlikuju prema vrstama spojeva koje hidroliziraju. BChE je manje selektivna prema veličini i prirodi acilne skupine estera koja se hidrolizira. Dobro hidrolizira butirilkolin i benzoilkolin.^{11,21} BChE također možemo naći u živčanim i glija stanicama ljudskog mozga.⁶

Fiziološka uloga BChE još uvijek nije dobro istražena. Nije esencijalna za prijenos živčanih impulsa, ali ima naznaka da je njena uloga važna tijekom nastajanja živčanog sustava, da je uključena u metabolizam lipida i lipoproteina, diferencijaciji i rastu živčanih stanica, detoksifikaciji različitih otrova te regulaciji količine ACh u glatkim mišićima.^{11,20} Nedavno je predloženo da BChE može poslužiti kao spremište enzima, preuzimajući ulogu u regulatornom mehanizmu AChE u kolinergičnoj sinapsi pri određenim uvjetima.⁶

Strukturno se BChE razlikuje od AChE u 55% aminokiselinskih sekvencija, ali ima slične katalitičke osobine.²² Različita specifičnost prema nekim supstratima, ireverzibilnim inhibitorima i reverzibilnim ligandima uzrokovana je strukturnom razlikom aktivnih mjesta za nekoliko aminokiselina. Phe je zamjenjen manjim aminokiselinama (Leu, Ile ili Val) što stvara veći acilni džep koji prima veće skupine kao što su butanoil ili benzoil.²¹ BChE iz različitih organizama se također razlikuju u primarnoj strukturi te aminokiselinama u aktivnom mjestu koje ne moraju biti očuvane. Konjska BChE dijeli 90,4 % aminokiselinskih sekvencija s ljudskom BChE i 82,2 % s mišjom BChE. Usporedba aminokiselinskih sekvencija je pokazala da se ljudska, konjska i mišja BChE razlikuju u 15 aminokiselina. Međutim, trodimenzijski prikaz konjske BChE pokazao je da se između tih 15 aminokiselina samo Thr69 nalazi blizu perifernog veznog mjesta. Aminokiseline na položaju 277, Val, Ala i Arg te na položaju 285 Leu, Pro i Ile nalaze se u konjskoj, ljudskoj i mišjoj BChE te se pretpostavlja da su s aminokiselinom na položaju 69 odgovorne za različite inhibicije tih triju BChE.²²



Slika 4. Struktura ljudske BChE.²³

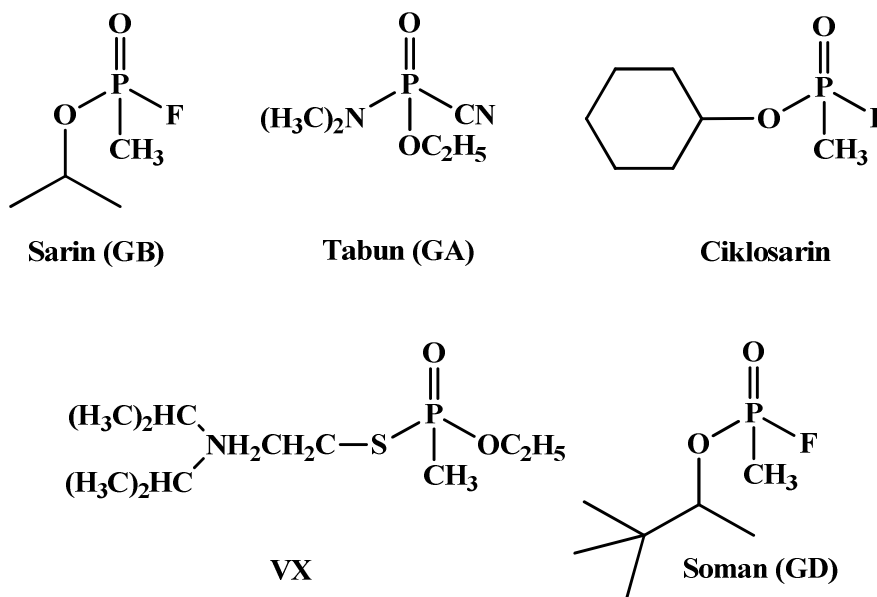
2.3. ORGANOFOSFORNI SPOJEVI

Organofosforne (OP) spojevi su u širokoj primjeni kao pesticidi, insekticidi te kao živčani bojni otrovi. To su spojevi koji inhibiraju AChE i BChE zbog čega dolazi do znatnih fizioloških promjena u organizmu, a također mogu uzrokovati i smrt. Godišnje 220 000 ljudi umire od trovanja OP spojevima.²⁴

OP spojevi su organske molekule koje sadrže fosforilnu (P=O) ili tiofosforilnu skupinu (P=S). U te spojeve ubrajamo estere, amide ili tiolne derivate fosforne, fosforaste ili hipofosforaste kiseline s drugačijim vezanjem atoma kisika, ugljika, dušika ili sumpora.²⁵

Klasifikacija OP spojeva je kompleksna zbog mogućnosti raznovrsnog vezanja bočnih lanaca na atom fosfora.²⁶

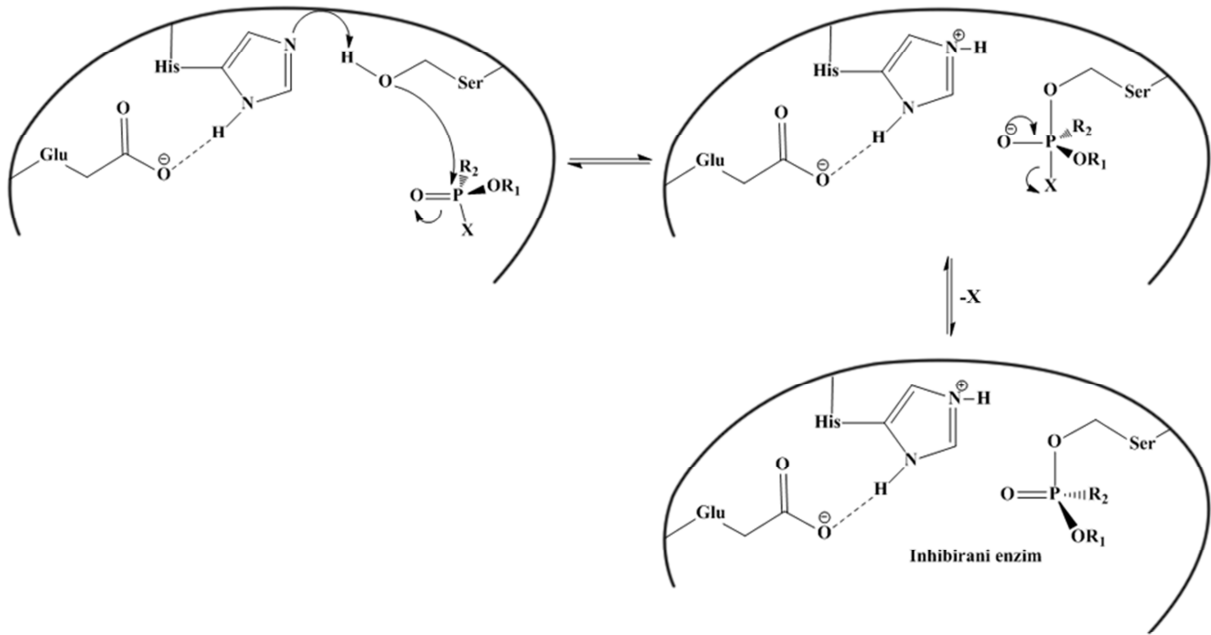
OP spojevi koji se koriste kao živčani bojni otrovi su toksičniji od OP spojeva koje nalazimo u insekticidima. Većina živčanih bojnih otrova su fosfonofluoridati i *S*-supstituirani fosfonotioati, dok OP spojevi u insekticidima su fosfonotioati s P=S vezom.¹ Neki od poznatih živčanih bojnih otrova su Tabun, Sarin, Soman i VX (slika 5.).²



Slika 5. Strukture nekih živčanih bojnih otrova.^{1,2}

2.3.1. MEHANIZAM INHIBICIJE AChE S ORGANOFOSFORNIM SPOJEVIMA

OP spojevi inhibiraju AChE te sprječavaju hidrolizu ACh što dovodi do nakupljanja ACh u svim kolinergičnim sinapsama i rezultira prekomjernom stimulacijom s ACh. Mehanizam reakcije uključuje nukleofilni napad serina u AChE katalitičkoj trijadi na atom fosfora iz OP spoja. Za razliku od acetilirane AChE, koja se brzo regenerira i otpušta octenu kiselinu, fosforilirani enzim je stabilan i teško se reaktivira. Inhibirani enzim, kada je fosforiliran, ne može hidrolizirati ACh (slika 6.). Reakcija se može opisati adicijsko-eliminacijskim mehanizmom u dva stupnja. Adicija je korak koji određuje brzinu reakcije.¹



Slika 6. Mehanizam inhibicije AChE s OP spojevima (X = izlazna skupina).

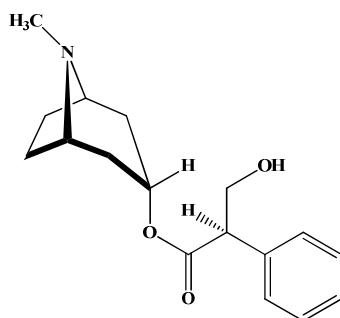
OP spojevi su inhibitori i BChE pa se ona može koristiti kao „sakupljač“, spoj koji razgrađuje ili veže otrove prije njihovog ireverzibilnog vezanja za enzim.²⁷⁻³¹

2.4. OKSIMI KAO ANTIDOTI

Terapija protiv trovanja OP spojevima uključuje tri vrste supstancija:³²⁻³⁵

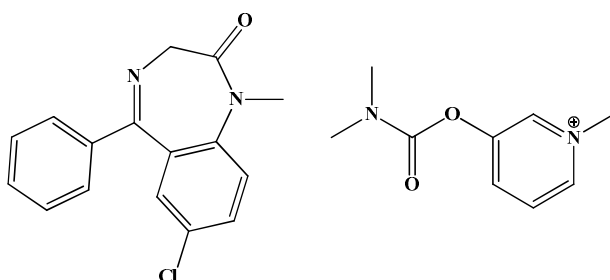
1. Antikolinergičke supstancije koje smanjuju utjecaj nakupljenog acetilkolina u kolinergičkim receptorima
2. Depresore središnjeg živčanog sustava koji pokazuju anikonvukzivno djelovanje
3. Oksime koji kao reverzibilni inhibitori štite enzim od fosforiliranja, a također djeluju kao reaktivatori inhibiranog enzima

Atropin je najčešće korišteni antikolinergik (slika 7.). Natječe se s ACh za muskarinske receptore te na taj način ublažava utjecaj nakupljenog ACh. Atropin ne sprječava inhibiciju AChE.



Slika 7. Struktura atropina.

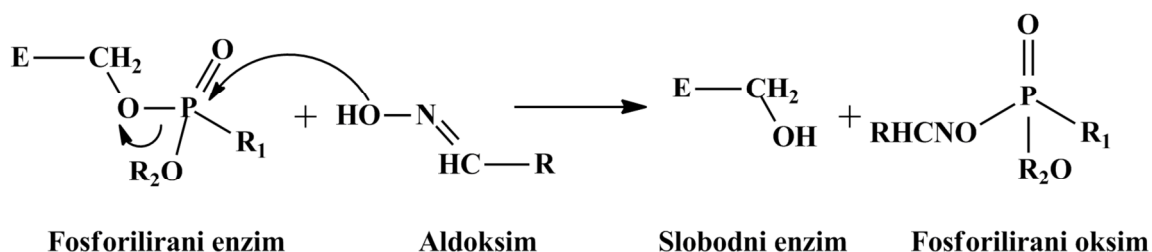
Depresori središnjeg živčanog sustava ublažavaju grčenje mišića do kojeg dolazi zbog akumulacije ACh. Najčešće korišteni spojevi iz ove skupine su diazepam i piridostigmin bromid (slika 8.).



Slika 8. Strukture diazepam (lijevo) i piridostigmina (desno).

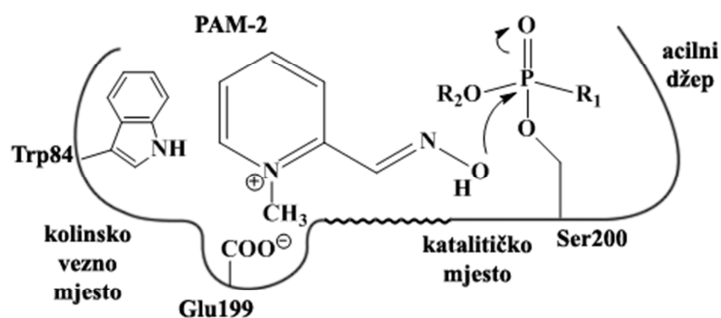
AChE i BChE posjeduju dva vezna mjesta za supstrat i reverzibilne inhibitore – katalitičko i periferno alosteričko mjesto. Vežanje liganda na katalitičko mjesto inhibira enzim dok je alosteričko mjesto katalitički neaktivno. Bez obzira na neaktivnost, vežanje liganda na alosteričko mjesto također može uzrokovati promjene katalitičkih svojstava enzima. Piridinijevi, imidazolijevi i kinuklidinijevi oksimi su reverzibilni inhibitori AChE i BChE te na taj način štite enzim od reakcije s OP spojevima. Spojevi koji se vežu na oba mjesta na enzimu su redovito bolja *in vitro* zaštita od onih koji se vežu samo na jedno mjesto.²

Ključno svojstvo antidota za OP spojeve jest reaktivacija već fosforiliranog enzima.³⁶ Prilikom reaktivacije enzima oksimska hidroksilna skupina nukleofilno će napasti elektrofilni atom fosfora pri čemu dolazi do oslobađanja aktivnog mjesta enzima i fosforiliranja oksima (shema 1).²



Shema 1. Reaktivacija fosforiliranog enzima.²

Istraživanja su pokazala da antidot mora imati određena strukturna obilježja kako bi pokazao dobra reaktivatorska svojstva.¹ Kvaterni dušikov atom uvelike olakšava ulazak antidota u aktivno mjesto enzima zbog interakcije s anionskim bočnim ograncima koji se tamo nalaze. Antidot mora posjedovati bar jednu oksimsku skupinu koja je s heterocikličkom jezgrom povezana alifatskom poveznicom odgovarajuće čvrstoće i duljine kako bi se nukleofilni kisikov atom našao u prikladnom položaju za reakciju (slika 9).²

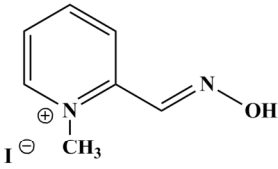
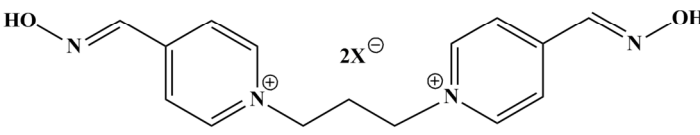
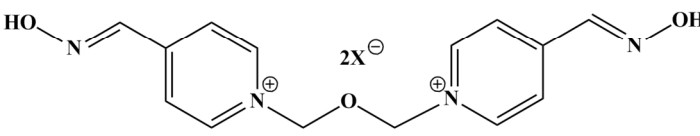
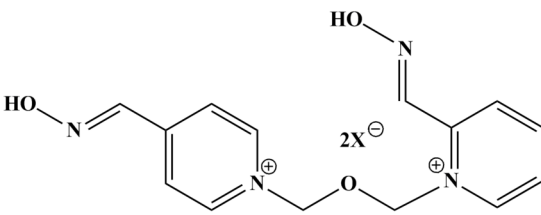


Slika 9. Shematski prikaz usmjerenja PAM-2 u aktivnom mjestu fosforilirane AChE.²

Prednost oksimske pred ostalim nukleofilnim skupinama još nije razjašnjena.^{37, 38}

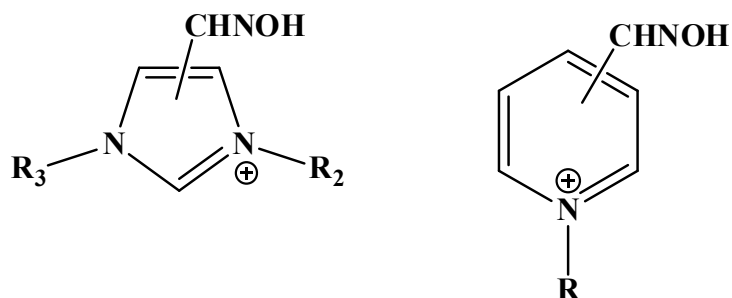
U potrazi za što djelotvornijim oksimskim reaktivatorima istraženi su brojni mono i biskvaterni piridinijevi aldoksimi od kojih se neki i primjenjuju u humanoj terapiji, no nijedan od njih nije univerzalan (tablica 1.).³⁹

Tablica 1. Oksimi koji se primjenjuju kao antidoti u humanoj terapiji pri trovanju OP spojevima.³⁹

OKSIM	STRUKTURA	ZAŠTITNO DJELOVANJE
PAM-2 (pralidoxime)		zadovoljavajući antidot sarinu i VX, ne reaktivira tabunom i sarinom fosforiliranu AChE
TMB-4 (trimedoxime)		vrlo dobar antidot tabuna, sarina i VX, kontraindiciran kod trovanja somanom
TOKSOGONIN (toxogonine, obidoxime)		vrlo dobar antidot sarina, VX i raznih pesticida, antidot tabuna, kontraindiciran kod trovanja somanom
HI-6		izvrstan antidot VX, somana, sarina, vrlo slabo djelovanje pri trovanju tabunom

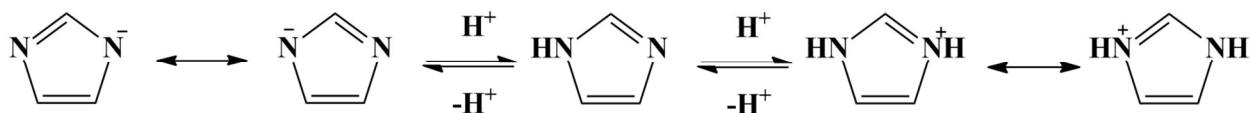
2.5. ANTIDOTSKA AKTIVNOST DERIVATA IMIDAZOLA

Zbog strukturne sličnosti s piridinom, istraživanja antidotske aktivnosti usmjerena su prema imidazolijevim aldoksimima (slika 10.).^{40,41}



Slika 10. Opće strukturne formule imidazolijevih i piridinijevih aldoksima.^{40,41}

Imidazol je planarni heterociklički spoj aromatskog karaktera. Važan je kao strukturna jedinica esencijalne aminokiseline histidina, te njegovom dekarboksilacijskom produktu histaminu koji je i kemijski neurotransmiter. Polarani je i stoga je topljiv u vodi i drugim polarnim otapalima. Imidazolni prsten je amfoteran što ima važnu funkciju u aktivnim mjestima enzima. Slobodni imidazol je srednje jaka organska baza ($pK_a = 7,0$), a može djelovati i kao kiselina ($pK_a = 14,5$). Pri fiziološkom pH od 7,4 podjednake su koncentracije protoniranog i neutralnog imidazola. Dolazi u dva jednaka tautomerna oblika jer se vodikov atom može nalaziti na bilo kojem od dva dušika u prstenu. Kation i anion su simetrično delokalizirane strukture (shema 6).⁴²



Shema 6. Rezonancijske strukture imidazola.⁴³

Imidazol je klasificiran kao aromatski spoj zbog prisutnosti šest π -elektrona (elektronski par na protoniranom dušiku, te četiri elektrona iz dvostrukih veza). Odličan je

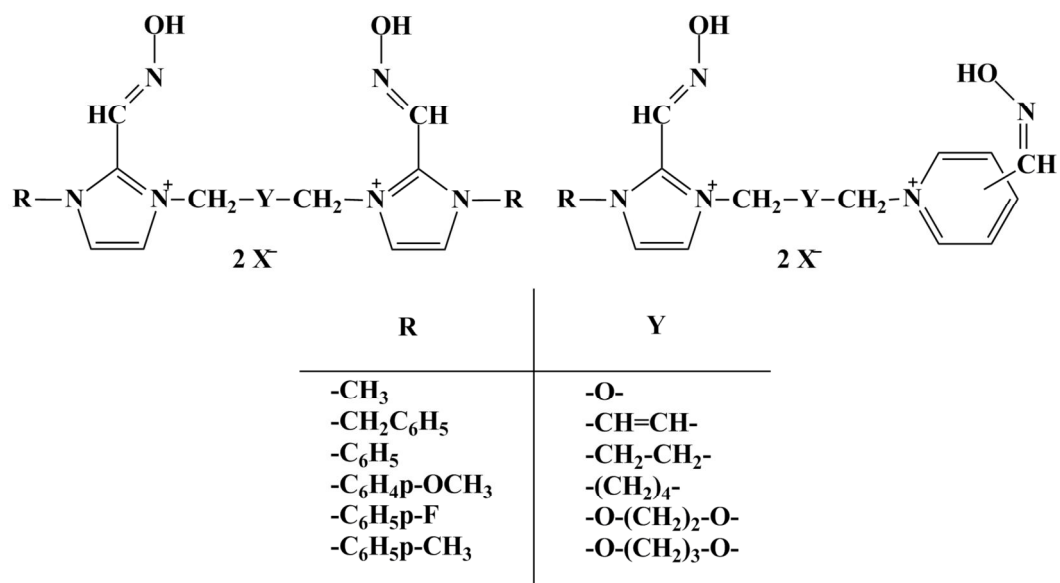
nukleofil zato što slobodni elektronski par na dušikovom atomu nije uključen u aromatski sustav.^{42,44}

Dodatni razlog za proučavanje imidazolijevih aldoksima jesu laka kvaternizacija dušikovog atoma i optimalna kiselost oksimske hidroksilne skupine ($pK_a=8$).⁴⁵ Također se pretpostavlja da će delokalizacija naboja između dva dušikova atoma doprinosti boljem vezanju na aktivno mjesto enzima.

Istraživana je antidotska aktivnost derivata imidazola kao reaktivatora AChE koja je inhibirana s diizopropil-fosfluoridatom. Samo su se derivati 2-hidroksiiminometilimidazola pokazali kao aktivni u *in vitro* pokusima. Uočeno je da je zamjena 1-metilne skupine s 1-arilnom rezultirala boljom reaktivacijom *in vitro*.⁴⁶

Pripravljen je veliki broj mono i biskvaternih imidazolijevih oksima koji su ispitani *in vitro*, a neki i *in vivo* na miševima.^{41,47,48} Pokazalo se da se uvođenjem razgranatih supstituenata znatno smanjuje reakcijska djelotvornost spojeva *in vitro*.⁴⁷ Međutim, u pokusima *in vivo* na miševima, takvi spojevi su se pokazali kao bolji antidoti.^{41,47} Slaba korelacija između rezultata *in vivo* i *in vitro* ukazala je da imidazolijevi spojevi mogu antidotski djelovati i drugim mehanizmima osim reaktivacije fosforilirane AChE.^{49,50} Pretpostavljeno je da je prevladavajući mehanizam antidotskog djelovanja upravo reverzibilna, nekovalentna interakcija spoja s katalitičkim mjestom enzima jer nije primjećena interakcija ovih spojeva s nikotinskim i muskarinskim receptorima.⁴¹ Time se štiti organizam od fosforiliranja fizičkim blokiranjem pristupa organofosfatu.

Do danas su pripravljeni i ispitani derivati biskvaternih imidazolijevih i imidazolio-piridinijevih aldoksima čiji su prstenovi povezani različitim lancima (slika 11.). Određena su njihova antidotska svojstva i interakcija s AChE.^{43,51} Većina priređenih spojeva je pokazala da su jaki inhibitori AChE. Pokazalo se da vrsta supstituenta i duljina lanaca između prstenova znatno utječe na inhibitornu moć ovih spojeva. Također se pokazalo da su bisimidazolijevi spojevi jači inhibitori od imidazolio-piridinijevih.



Slika 11. Pripravljene spojevi biskvaternih imidazolijevih i imidazolio-piridinijevih aldoksima.²

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. OPĆE NAPOMENE

Sve upotrebljene kemikalije i otapala su bili analitičke čistoće ili su pročišćavana uobičajenim postupcima. Spojevi *N*-metilimidazol (Aldrich), *n*-butil-litij (Aldrich), *p*-nitrobenzil-bromid, *p*-brombenzil-bromid, *m*-metilbenzil-bromid, *m*-klorbenzil-bromid (Sigma-Aldrich), 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) (Sigma-Aldrich), acetiltiokolin (ATCh) (Fluka) i liofilizirana butirilkolinesteraza (*Eq*BChE) iz seruma konja (Sigma) su komercijalno dostupni, a ljudski serum (*Hu*BChE) i serum kunića (*RSB*ChE) su dobiveni s Imunološkog zavoda.*

Tijek reakcija, identifikacija i kontrola čistoće pripremljenih spojeva ispitivana je uzlaznom tankoslojnom kromatografijom (TSK), infracrvenom spektroskopijom (IR) te ^1H i ^{13}C (APT) nuklearnom magnetskom rezonancijom.

Uzlazna tankoslojna kromatografija je rađena na pločicama silikagela (DC-Alufolien Kiesegel 60 F₂₅₄, Merck). Supstancije su detektirane UV lampom i prskanjem s H₂SO₄.

IR spektri su snimani na FTIR Perkin-Elmer Spectrum Two spektrometru kao pastile kalijevog bromida ili kao tanki film na pločicama natrijeva klorida. Vrijednosti valnih brojeva su izraženi u cm⁻¹.

UV/VIS kinetička mjerenja su praćena na AnalytikJena Specord 200 spektrofotometru s termostatiranim kućištem pri 30 °C u kivetama s optičkim putem od 1 cm.

NMR spektri su snimljeni na spektrometru Bruker AV300 i/ili AV600 u deuteriranim otapalim na sobnoj temperaturi. Kemijski pomaci (δ) su izraženi u dijelovima na milijun (ppm) prema tetrametilsilanu (TMS, [(CH₃)₄Si]) kao unutrašnjem standardu ($\delta=0,00$ ppm), a konstante sprežanja (*J*) su izražene u hercima (Hz). Signali su označeni kao s=singlet, d=dublet, t=triplet, q=kvartet i m=multiplet.

* Imunološki zavod d.d., Rockefellerova ulica 2, 10000 Zagreb

Točke taljenja su određene na uređaju BÜCHI Melting Point (B540) u otvorenim kapilarama i nisu korigirane.

Optička skretanja odrađena su na polarimetru *SCHMIDT+HAENSCH* Polartronic NH8 (589 nm) na sobnoj temperaturi (25 °C) u ćeliji dugoj 1 dm. Koncentracije otopine izražena je kao masa otopljenog uzorka u 100 mL otopine (g/100 mL).

3.2. PRIPRAVA SPOJEVA

3.2.1. PRIPRAVA *N*-METILIMIDAZOL-2-KARBALDEHIDA⁵² (1)

U otopinu *N*-metilimidazola (10 mL, 12,6 mmol) u dietil-eteru (150 mL), koja je miješana i hladena na temperaturi -80 do -40 °C (suhi led-aceton), dodan je laganim dokapavanjem *n*-butil-litij (*n*-BuLi) (50 mL). Reakcijska smjesa je zatim miješana mehaničkom miješalicom 1 sat na temperaturi -80 do -40 °C. Nakon toga, u reakcijsku smjesu je dokapavana otopina DMF-a (15 mL) u dietil-eteru (20 mL). Dodatkom cijele količine otopine DMF-a smjesa je ostavljena preko noći kako bi temperatura postepeno narasla na sobnu temperaturu.

Nakon 24 sata, reakcijskoj smjesi je dodana otopina HCl (5 M, 75 mL). Vodeni sloj je odvojen, a organski je ekstrahiran s otopinom HCl (5 M, 3 x 30 mL). Kiseli vodeni ekstrakti su spojeni i zalučeni s otopinom Na₂CO₃ do pH=7-8, a zatim ekstrahirani ponovno diklormetanom (3 x 40 mL). Spojeni ekstrakti su upareni, a sirovi produkt je pročišćen destilacijom uz sniženi tlak.

Dobiven je spoj **1** (9,90 g, 71,7 %), t.v.=59-65 °C / 10 mmHg (lit. 65%, t.v.=89-95 °C/ 12 mmHg)⁵²

IR (NaCl) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3110 (=C-H); 2857 (C-H aldehyd); 1675 (C=O); 1517(C=N)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ/ppm : 4,024 (s, 3H,CH₃-N); 7,196 (s, 1H, Im-H1); 7,254 (s, 1H, Im-H2); 9,000 (s, 1H, -CHO)

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ/ppm : 34,14 (CH₃-N); 130,68 (Im-C2, Im-C4, Im-C5); 181,21 (CHO)

3.2.2. PRIPRAVA 2-HIDROKSIIMINOMETIL-1-METILIMIDAZOLA⁴⁰ (2)

Predestilirani *N*-metilimidazol-2-karbaldehid (**1**) (9,90 g, 90 mmol) je otopljen u minimalnoj količini etanola. Toj otopini je zatim dodana vodena otopina hidroksilamin-hidroklorida (6,30 g, 90,5 mmol) u vodi. pH otopine je podešen na pH=7-8 dodatkom vodene otopine Na₂CO₃. Otopina je zatim refluksirana jedan sat na 40 °C. Nakon toga u otopinu je dodana otopina HCl (4 M) do pH=5-6. (Ako kristali ne nastaju odmah otopinu je potrebno ohladiti). Nastali kristali su profiltrirani vakuum filtracijom. Nakon prekrizalizacije iz vode dobiven je 2-hidroksiiminometil-1-metilimidazol u obliku bijelih kristala.

Dobiven je spoj **2** (5,77 g, 51,3 %), t.t.=158,8-160,1 °C (lit. 70 %, t.t.=176 °C)⁴⁰

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3200-2500 (O-H, =C-H); 1518 (C=N); 978 (N-O)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ/ppm : 3,80 (s, 3H, CH₃-N); 6,98 (s, 1H, Im-H2); 7,25 (s, 1H, Im-H1); 8,05 (s, 1H, CH=N); 11,47 (s, 1H, OH)

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ/ppm : 35,18 (CH₃-N); 125,00 (Im-C2); 128,90 (Im-C4, Im-C5); 141,80 (CH=N-)

3.2.3. PRIPRAVA 2-HIDROKSIIMINOMETIL-*N,N'*-DIMETILIMIDAZOLIJEVOG JODIDA⁴⁶ (3)

2-hidroksiiminometil-1-metilimidazol (**2**) (2 g, 16,0 mmol) je otopljen u suhom acetonu (100 mL). Otopini je dodan metil-jodid (6 mL, 96,4 mmol) uz miješanje. Reakcijska smjesa je miješana (3 dana) na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije je praćen s tankoslojnom kromatografijom (TSK) na pločici silikagela. Nakon toga, žućkasti talog je profiltriran vakuum filtracijom i ispran suhim acetonom. Produkt je prekrizaliziran iz metanola.

Dobiven je spoj **3** (3,9483 g, 92,5 %) t.t.=210-211.8 °C (lit. t.t.=223-225 °C)⁴⁶

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3114 (O-H); 1623 (C=N-OH); 1526 (C=N); 986 (N-O)

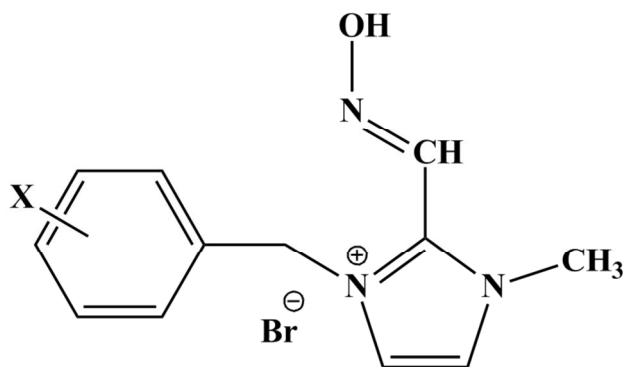
^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 3,92 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$); 7,81 (s, 2H, Im-H1, Im-H2); 8,52 (s, 1H, CH=N); 12,97 (s, 1H, OH)

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 36,50 (2x $\text{CH}_3\text{-N}$); 124,27 (Im-C2, Im-C4, Im-C5); 135,60 (CH=N)

3.2.4. PRIPRAVA BENZILNIH DERIVATA 2-HIDROKSIIMINOMETIL-3-METILIMIDAZOLIJEVIH BROMIDA⁴⁶

2-hidroksiiminometil-1-metilimidazol (**2**) (0,150 g, 1,2 mmol) je otopljen u suhom acetonu (10 mL). Toj otopini je zatim dodan *p*-nitrobenzil-bromid (0,295 g, 1,4 mmol) u blagom suvišku. Otopina je ostavljena 3-5 dana na 4 °C da produkt kristalizira. Tijek reakcije je praćen tankoslojnom kromatografijom (TSK) na pločici silikagela. Kvaterna sol (**4**), igličasti kristali, je profiltrirana vakuum filtracijom i isprana suhim acetonom. Produkt je prekrizaliziran iz acetonitrila. Spojevi **5**, **6** i **7** (tablica 2.) su pripremljeni na analogan način.

Tablica 2. Benzilni derivati 2-hidroksiiminometil-3-metilimidazolijevih bromida.



SPOJ	X	ISKORIŠTENJE	t_f / °C
4	<i>p</i> -NO ₂	55 %	209,1-210,0
5	<i>m</i> -Cl	34 %	151,2-153,0
6	<i>p</i> -Br	44 %	180,1-182,5
7	<i>m</i> -CH ₃	40 %	152,0-153,3

**2-HIDROKSIIMINOMETIL-3-METIL-1-(*p*-NITROBENZIL)-IMIDAZOLIJEV
BROMID (4)**

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3450-2700 (O-H, =C-H, C-H); 1643 (C=N-OH); 1520 i 1348 (NO₂); 1445-1400 (C=C); 990 (N-O)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ/ppm : 3,98 (s, 3H, CH₃-N); 5,82 (s, 2H, CH₂-N⁺); 7,55-7,58 (d, 2H, $J=8,82$ Hz, Bn-H₂, Bn-H₆); 7,96 (d, 1H, $J=1,96$ Hz, Im-H₅); 8,01 (d, 1H, $J=1,97$ Hz, Im-H₄); 8,23-8,26 (d, 2H, $J=8,81$ Hz, Bn-H₃, Bn-H₅); 8,599 (s, 1H, CH=N); 13,01 (s, 1H, OH)

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ/ppm : 37,15 (CH₃-N); 51,59 (CH₂-N⁺); 124,28 (Im-C₅, Bn-C₃, Bn-C₅); 125,72 (Im-C₄); 129,13 (Bn-C₂, Bn-C₆); 135,83 (Im-C₂); 137,90 (CH=N); 142,71 (Bn-C₁); 147,82 (Bn-C₄-NO₂)

**2-HIDROKSIIMINOMETIL-1-(*m*-KLORBENZIL)-3-METILIMIDAZOLIJEV
BROMID (5)**

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3450-2400 (O-H, =C-H, C-H); 1634 (C=N-OH); 1523 (C=N); 1477-1425 (C=C); 996-977 (N-O);

¹H NMR (DMSO-d₆) δ/ppm : 3,96 (s, 3H, CH₃-N); 5,66 (s, 2H, CH₂-N⁺); 7,28 (s, 1H, Bn-H₆); 7,43 (m, 3H, Bn-H₂, Bn-H₄, Bn-H₅); 7,93 (d, 1H, $J=1,93$ Hz, Im-H₅); 7,97 (d, 1H, $J=1,96$ Hz, Im-H₄); 8,60 (s, 1H, CH=N); 13,03 (s, 1H, OH)

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ/ppm : 37,15 (CH₃-N); 51,31 (CH₂-N⁺); 124,04 (Im-C₅); 125,06 (Im-C₄); 126,75 (Bn-C₆); 127,96 (Bn-C₂); 128,93 (Bn-C₄); 131,20 (Bn-C₅); 133,94 (Bn-C₃); 135,92 (Im-C₂); 137,71 (CH=N); 141,59 (Bn-C₁)

**2-HIDROKSIIMINOMETIL-1-(*p*-BROMBENZIL)-3-METILIMIDAZOLIJEV
BROMID (6)**

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3450-2700 (O-H, =C-H, C-H); 1614 (C=N-OH); 1518 (C=N); 1491-1417 (C=C); 998-986 (N-O)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ /ppm: 3,95 (s, 3H, CH₃-N); 5,63 (s, 2H, CH₂-N⁺); 7,28-7,30 (d, 2H, $J=8,46$ Hz, Bn-H2, Bn-H6); 7,60-7,63 (d, 2H, $J=8,45$ Hz, Bn-H3, Bn-H5); 7,92 (d, 1H, $J=1,95$ Hz, Im-H5); 7,96 (d, 1H, $J=1,98$ Hz, Im-H4); 8,59 (s, 1H, CH=N); 13,01 (s, 1H, OH)

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ /ppm: 37,22 (CH₃-N); 51,42 (CH₂-N⁺); 122,18 (Bn-C4-Br); 124,03-125,65 (Im-C5, Im-C4); 130,52 (Bn-C2, Bn-C6); 131,94 (Bn-C3, Bn-C5); 134,57 (Bn-C1); 135,79 (Im-C2); 137,62 (CH=N)

2-HIDROKSIIMINOMETIL-1-(*m*-METILBENZIL)-3-METILIMIDAZOLIJEV BROMID (7)

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3450-2400 (O-H, =C-H, C-H); 1633 (C=N-OH); 1523 (C=N); 1477-1424 (C=C); 996-977 (N-O);

¹H NMR (DMSO-d₆) δ /ppm: 3,29 (s, 3H, Bn-CH₃); 3,94 (s, 3H, CH₃-N); 5,64 (s, 2H, CH₂-N⁺); 7,28 (s, 1H, Bn-H6); 7,42 (s, 3H, Bn-H2, Bn-H4, Bn-H5); 7,91-7,90 (d, 1H, $J=1,93$ Hz, Im-H5); 7,96-7,95 (d, 1H, $J=1,94$ Hz, Im-H4); 8,58 (s, 1H, CH=N); 13,00 (s, 1H, OH)

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ /ppm: 36,66 (CH₃-N); 50,90 (CH₂-N⁺); 123,54 (Im-C5); 125,17 (Im-C4); 126,32 (Bn-C6); 127,48 (Bn-C4); 128,4 (Bn-C2); 130,7 (Bn-C5); 133,46 (Bn-C3); 135,4 (Im-C2); 137,12 (CH=N); 137,14 (Bn-C1)

3.2.5. PRIPRAVA D-FRUKTOZA-OKSIMA⁵³ (8)

Otopina hidroksilamina (0,65 g, 9 mmol) u suhom metanolu (5 mL) neutralizirana je na 0 °C otopinom natrijeva metoksida u metanolu (pripremljen otapanjem 0,18 g natrija u 1 mL metanola). Nastali bijeli talog je profiltriran i ispran suhim metanolom. U filtrat koji sadrži neutralizirani hidroksilamin dodana je D-fruktoza (1 g, 5,55 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 24 h na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno i dobiven je bezbojni uljasti produkt.

Dobiven je uljasti produkt **8** (0,926 g, 85,5 %) $[\alpha]_D^{25} = -21^\circ$ (c=1, MeOH)

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3500-2600 (OH, C-H); 1646 (C=N-OH); 1520-1410 (C=N); 930-894 (N-O)

^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 3,32-3,39 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O}$ (C1)); 3,52-3,60 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O}$ (C6)); 3,90-3,94 (d, 1H, $J=12,26$ Hz, H4); 4,18-4,22 (d, 1H, $J=12,34$ Hz, H3); 4,31-4,41 (m, 1H, H5); 4,50 (s, 1H, C-OH (C3)); 4,79-4,92 (m, 3H, C-OH (C4, C5, C6)); 5,18-5,19 (d, 1H, $J=3,99$ Hz, C-OH (C1)); 10,64 (s, 1H, N-OH)

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 60,31 (C1); 63,95 (C6); 66,16 (C3); 71,44 (C5); 72,04 (C4); 160,74 (CH=N)

3.2.6. PRIPRAVA D-RIBOZA-OKSIMA⁵⁴ (9)

Otopina hidroksilamin-hidroklorida (0,687 g, 9,9 mmol) u suhom metanolu (6,6 mL) hlađena je pri 0 °C i neutralizirana kalijevim tert-butoksidom (1,037 g, 9,24 mmol) uz miješanje. Nastali bijeli talog je profiltriran i ispran suhim metanolom (3 mL). U filtrat koji sadrži neutralizirani hidroksilamin dodana je D-riboza (1 g, 6,66 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 12 h na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno, a zaostaje uljasti produkt koji stajanjem kristalizira (9).

Dobiven je produkt 9 (0,880 g, 80 %)

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3450-2700 (OH, C-H); 1643 (C=N-OH); 1511-1409 (C=N); 934-890 (N-O)

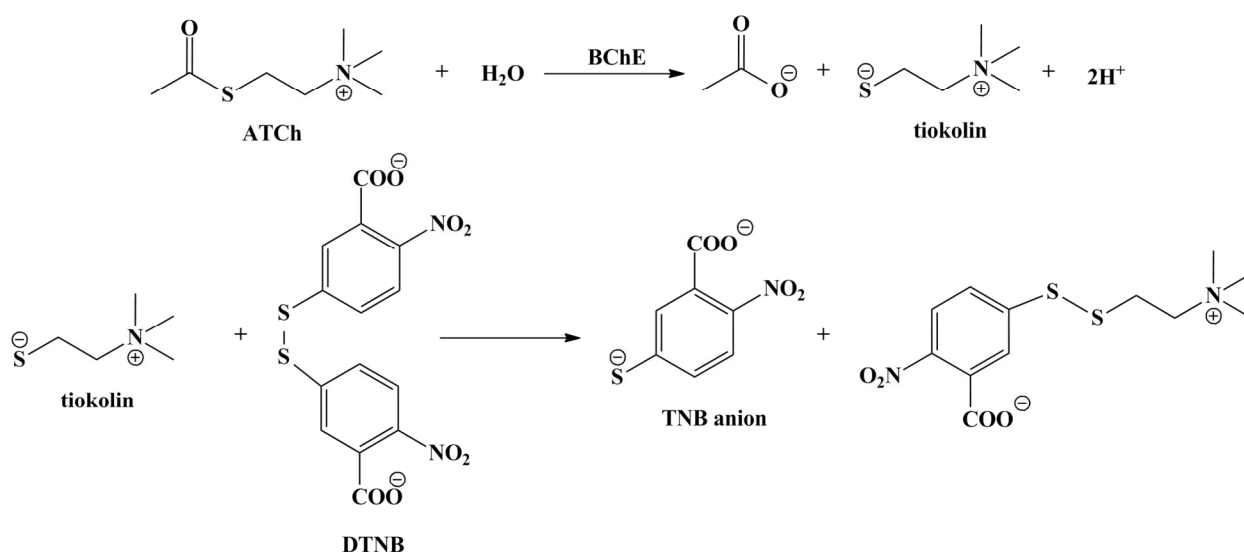
^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 3,33-3,59 (m, 4H, C-OH); 4,30-4,35 (d, 2H, $J=4,85$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$); 4,72-4,73 (d, 1H, $J=5,4$ Hz, H2); 4,82-4,84 (m, 1H, H4); 5,03-5,04 (d, 1H, $J=4,85$ Hz, H3); 6,65-6,67 (d, 1H, $J=6,32$ Hz, CH=N); 10,76 (s, 1H, N-OH)

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 63,82 (C3); 66,07 (C5); 71,87 (C4); 73,94 (C2); 152,29 (CH=N)

3.3. ENZIMSKA KINETIKA

3.3.1. MJERENJE AKTIVNOSTI ENZIMA

Aktivnost BChE mjerena je spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu uz supstrat ATCh i DTNB pri 30 °C.⁵⁵ Shematski je prikazana reakcija tiokolina i DTNB na kojoj se temelji Ellmanova metoda (shema 7).



Shema 7. Reakcija u Ellmanovoj metodi mjerenja aktivnosti BChE.

Hidrolizom supstrata oslobođeni tiokolin reagira s tiolnim reagensom (DTNB) pri čemu se oslobađa žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB anion). Povećanje apsorbancije TNB aniona koje odgovara povećanju koncentracije tiokolina, praćeno je pri $\lambda=412 \text{ nm}$ ($\epsilon=14250 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁵⁵

Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti enzima sadržavala je ATCh (0,1 - 0,9 mmol dm^{-3}), DTNB (3,3 mmol dm^{-3}), enzim (*Eq*BChE 50 μL 0,1 g dm^{-3} ; *Hu*BChE 20 μL ; *RS*BChE 50 μL) i fosfatni pufer (0,1 mol dm^{-3} , pH=7,4). Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 3 mL. S mjerenjem se počelo otprilike 5 sekundi nakon dodatka enzima u reakcijsku smjesu, a trajalo je 4 minute. Svi su uzorci pokazali linearnu ovisnost apsorbancije o vremenu.

3.3.2. MJERENJE REVERZIBILNE INHIBICIJE

Mjerena je reverzibilna inhibicija butirilkolinesteraze iz seruma čovjeka (*HuBChE*), kunića (*RSBChE*) te butirilkolinesteraze liofilizirane iz seruma konja (*EqBChE*) s oksimima **3-9** u prisutnosti ATCh (0,1-0,9 mmol dm⁻³) pri 30 °C. Koncentracija oksima je odabrana tako da inhibicija bude u rasponu od 20 - 80 %.

Reakcijska smjesa ukupnog volumena 3 mL sadržavala je oksim (1 mmol dm⁻³ za oksime **3-7**, a 12 mmol dm⁻³ za oksime **8 i 9**), ATCh (0,1-0,9 mmol dm⁻³), DTNB (3,3 mmol dm⁻³) enzim (*EqBChE* 50 μL 0,1 g dm⁻³; *HuBChE* 20 μL; *RSBChE* 50 μL) i fosfatni pufer (0,1 mol dm⁻³, pH=7,4). Svako je mjerenje započelo otprilike 5 sekundi nakon dodatka enzima u reakcijsku smjesu i trajalo je 4 minute.

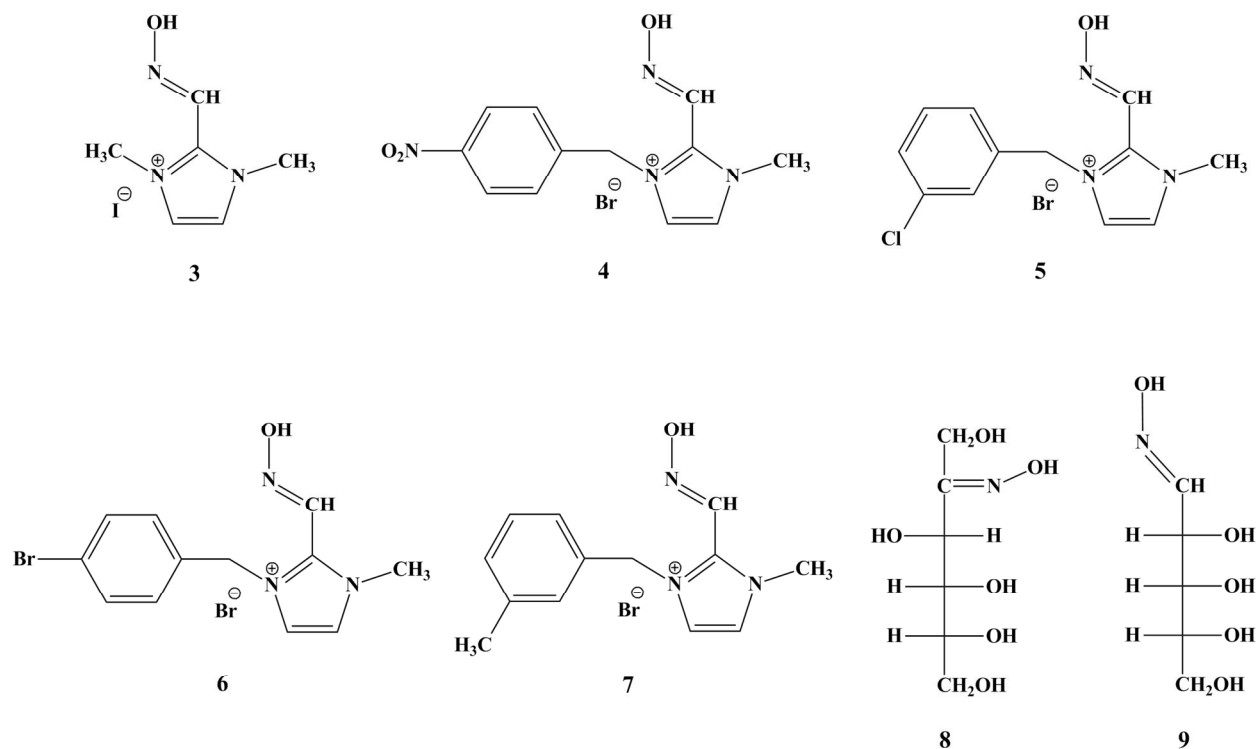
Do reverzibilne inhibicije dolazi stvaranjem adicijskog kompleksa enzima i inhibitora vezanjem inhibitora na aktivno i/ili periferno mjesto enzima.⁵⁶ Inhibiciju pri određenoj koncentraciji supstrata moguće je izračunati prema jednadžbi:

$$inhibicija = \frac{v_0 - v_I}{v_0} \cdot 100 \%$$

gdje je v_0 aktivnost enzima u odsustvu inhibitora te v_I aktivnost enzima u prisustvu određene koncentracije inhibitora.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je opisana priprava različitih vrsta oksima (slika 12.) te je ispitana njihova interakcija s BChE iz različitih organizama.

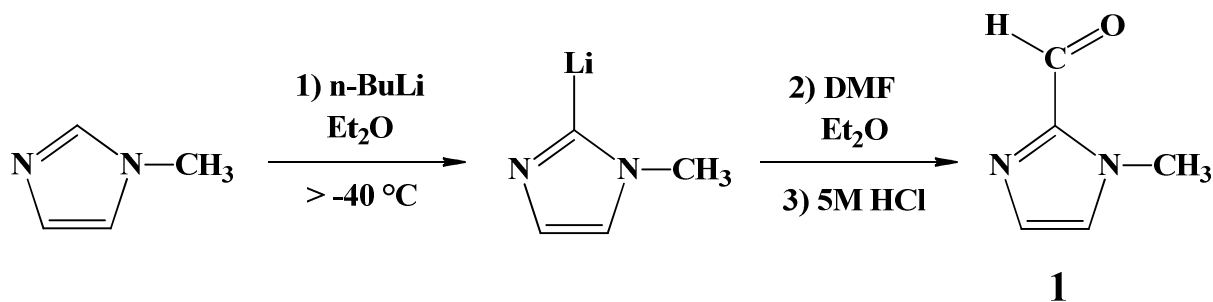


Slika 12. Pripravljene kvaterni imidazolijevi oksimi i oksimi D-fruktoze i D-riboze.

4.1. PRIPRAVA SPOJEVA

4.1.1. N-METILIMIDAZOL-2-KARBALDEHID

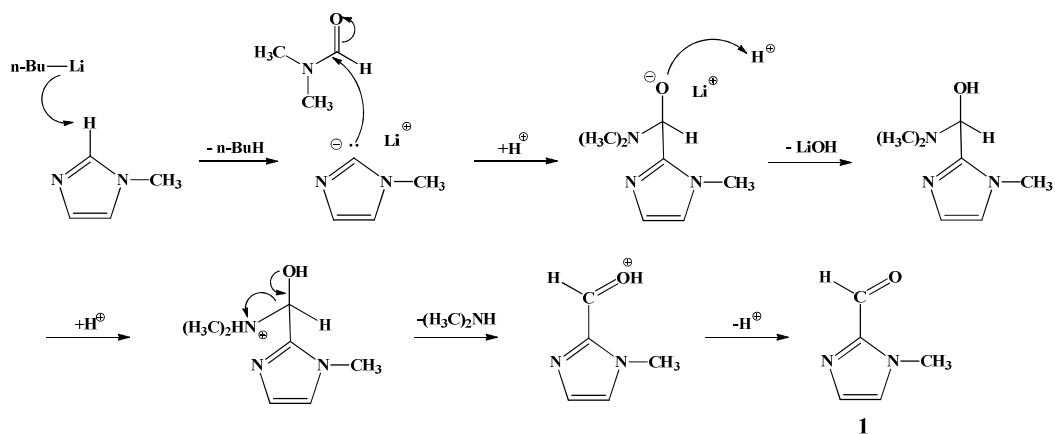
Priprava spoja 1 provedena je reakcijom početnog spoja *N*-metilimidazola s nizom reagensa u dietil-eteru prema prethodno opisanim postupcima (shema 8).^{41,52}



Shema 8. Priprava *N*-metilimidazol-2-karbaldehida.

Reakcija *N*-metilimidazola s *n*-BuLi je vrlo egzotermna i burna. *n*-BuLi služi za deprotonaciju ugljikovog (C2) atoma u *N*-metilimidazolu koji je najkiseliji zbog toga što dva susjedna dušikova atoma stabiliziraju nastali anion. Organolitijev međuprodukt koji nastaje je potrebno čuvati na temperaturama nižim od $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ jer je pri višim temperaturama nestabilan. *n*-BuLi vrlo burno reagira s vlagom iz zraka i postoji mogućnost zapaljenja stoga se mora dodavati vrlo pažljivo i u odsustvu vlage. Cijela reakcija provodi se u inertnoj atmosferi dušika.

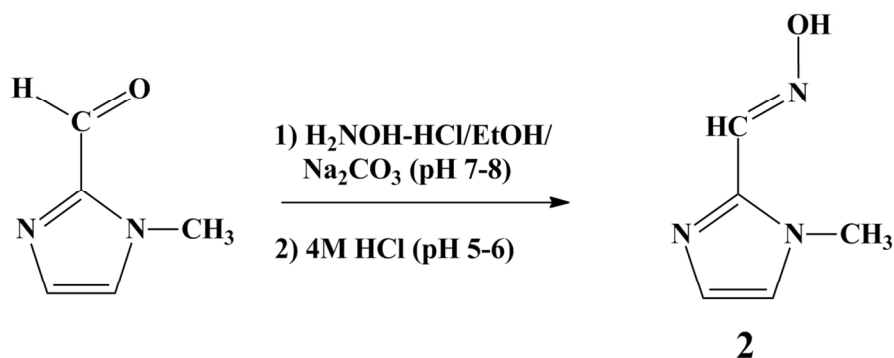
DMF (dimetil-formamid) se također dokapava polagano i pažljivo u reakcijsku smjesu pri niskoj temperaturi zbog vrlo velike reaktivnosti organolitijeva spoja. Reakcijom organolitijevog međuprodukta, odnosno nukleofilnim napadom na karbonilni ugljikov atom DMF-a nastaje kompleks koji zakiseljavanjem reakcijske smjese prelazi u konačni produkt. Vodeni ekstrakti se zaluže s Na_2CO_3 i ekstrahiraju diklormetanom. Otopina soli se dodaje radi isoljavanja i istiskivanja produkta u organsko otapalo. Upareni produkt se pročisti destilacijom pri sniženim tlakom.



Shema 9. Mehanizam priprave *N*-metilimidazol-2-karbaldehida.

4.1.2. 2-HIDROKSIIMINOMETIL-1-METILIMIDAZOL

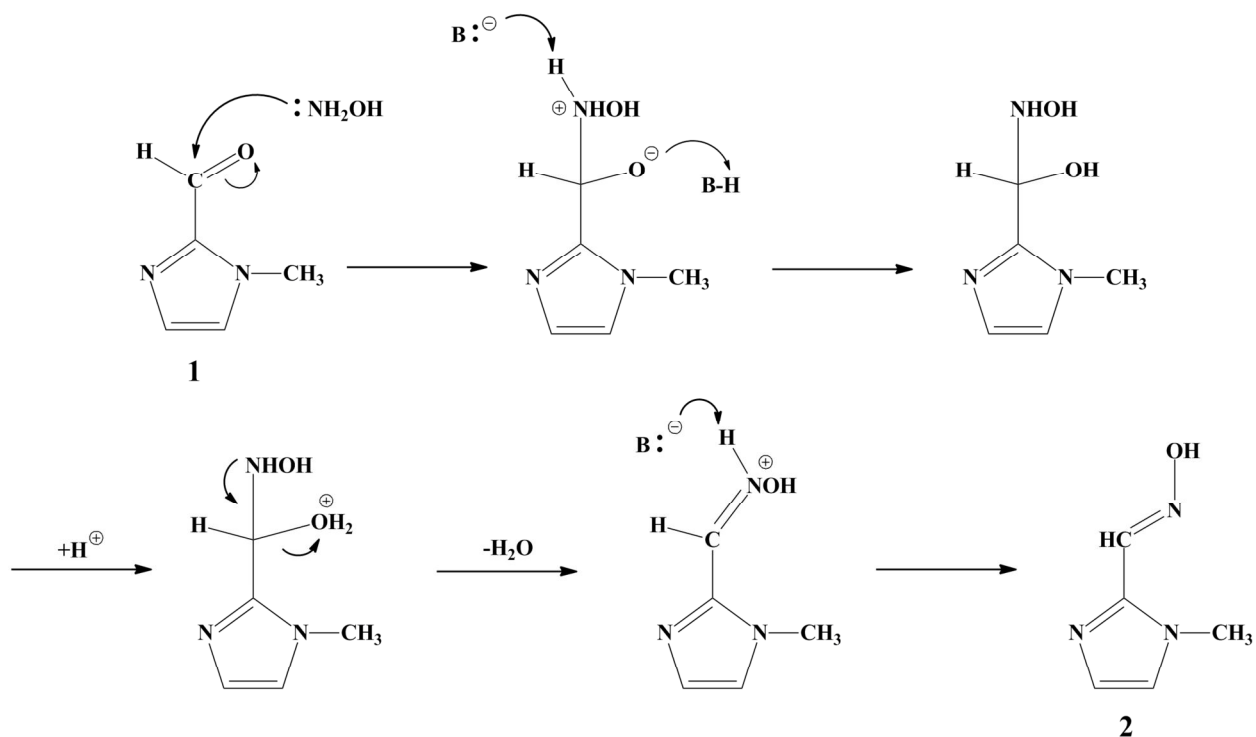
Priprava spoja **2** provedena je reakcijom *N*-metilimidazol-2-karbaldehida i hidroksilamin-hidroklorida u etanolu (shema 10).^{40,41}



Shema 10. Priprava 2-hidroksiiminometil-1-metilimidazola.

Reakcija predstavlja klasični primjer priprave oksima iz ketona u reakciji s hidroksilaminom.⁵⁷

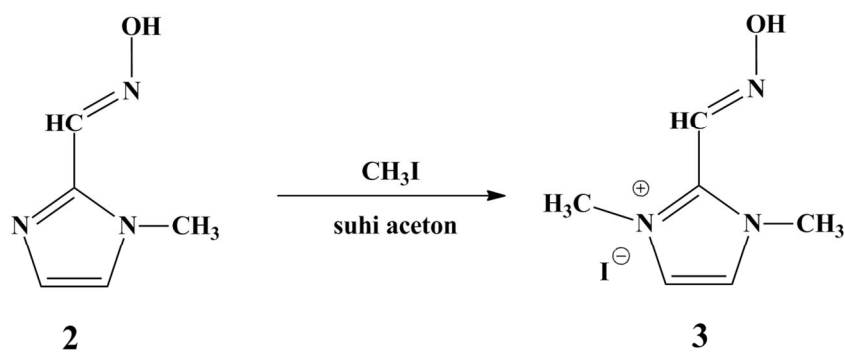
Reakcija se odvija u minimalnoj količini etanola. Zbog toga što je dušik u hidroksilamin-hidrokloridu kvaterniziran, nije reaktivan pa se stoga dodaje baza koja neutralizira HCl i tako oslobađa reaktivni oblik hidroksilamina, H_2NOH . Hidroksilamin nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom u *N*-metilimidazol-2-karbaldehidu (shema 11). Reakcija se odvija u blago lužnatim uvjetima (pH=7-8) jer oni najbolje pogoduju nastanku oksima. U prekiseloj sredini se hidroksilamin protonira i nije u mogućnosti nukleofilno napasti aldehyd. Bazični medij pogoduje nukleofilnosti hidroksilamina, ali ne može doći do protoniranja –OH skupine čime bi se postigla bolja izlaznost skupine. Reakcijska smjesa se zagrijava na blagoj temperaturi od 40 °C. Po završetku reakcije oprezno se dodaje klorovodična kiselina za neutralizaciju neizreagirale baze što također uzrokuje taloženje produkta. Prejakim zakiseljavanjem nastaje kvaterni amonijev produkt koji je dobro topljiv u polarnom mediju. Ako kristali ne nastanu odmah, potrebno je tikvicu s reakcijskom smjesom ohladiti. Stajanje u hladnjaku pospješuje stvaranje kristala. Konačni prekrizalizirani spoj **2** je kristaličan i bijele boje te je dobiven u iskorištenju od 51,3 %.



Shema 11. Mehanizam sinteze aldoksima.

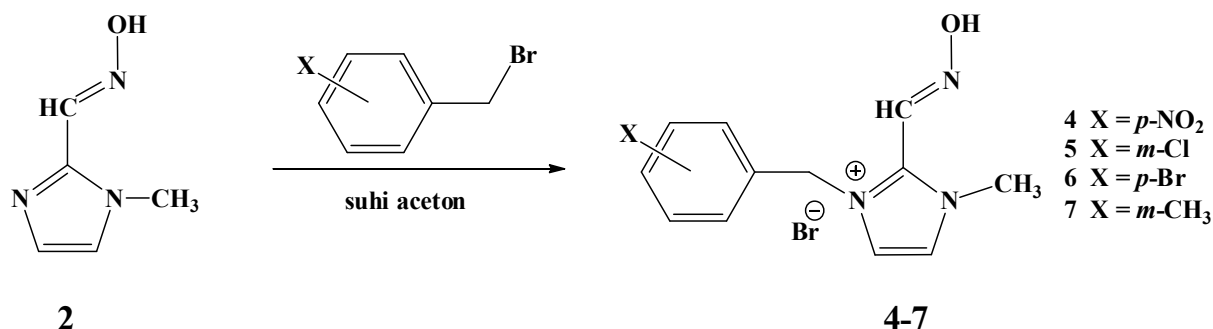
4.1.3. KVATERNI DERIVATI IMIDAZOL-2-ALDOKSIMA

Spoj 3 je pripravljen otapanjem 2-hidroksiiminometil-1-metilimidazola i metil jodida u suhom acetonu. Reakcija je provođena 3 dana na sobnoj temperaturi zaštićena od svjetlosti. Produkt, kvaterna sol 3, taloži iz reakcijske smjese zbog slabe topljivosti u acetonu (shema 12).^{46,58}



Shema 12. Priprava 2-hidroksiiminometil-*N,N*-dimetilimidazolijevog jodida.

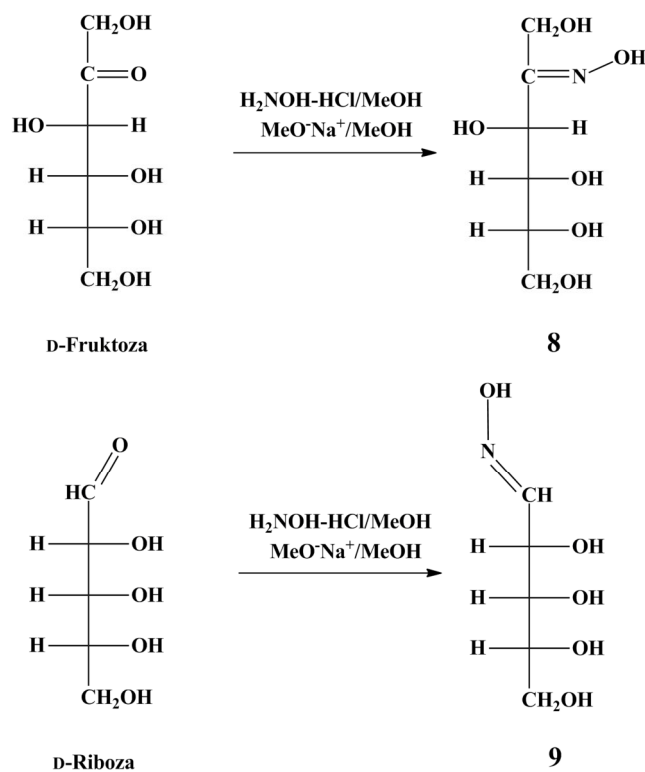
Spojevi **4-7** su pripravljeni otapanjem 2-hidroksiiminometil-1-metilimidazola i odgovarajućeg benzil-bromida u suhom acetonu. Produkti, kvaterne soli **4-7**, talože iz reakcijske smjese nakon 3-5 dana na 4 °C zbog slabe topljivosti u acetonu (shema 13).⁴⁶



Shema 13. Priprava benzilnih derivata 2-hidroksiiminometil-3-metilimidazolijevih bromida.

4.1.4. OKSIMI D-FRUKTOZE I D-RIBOZE

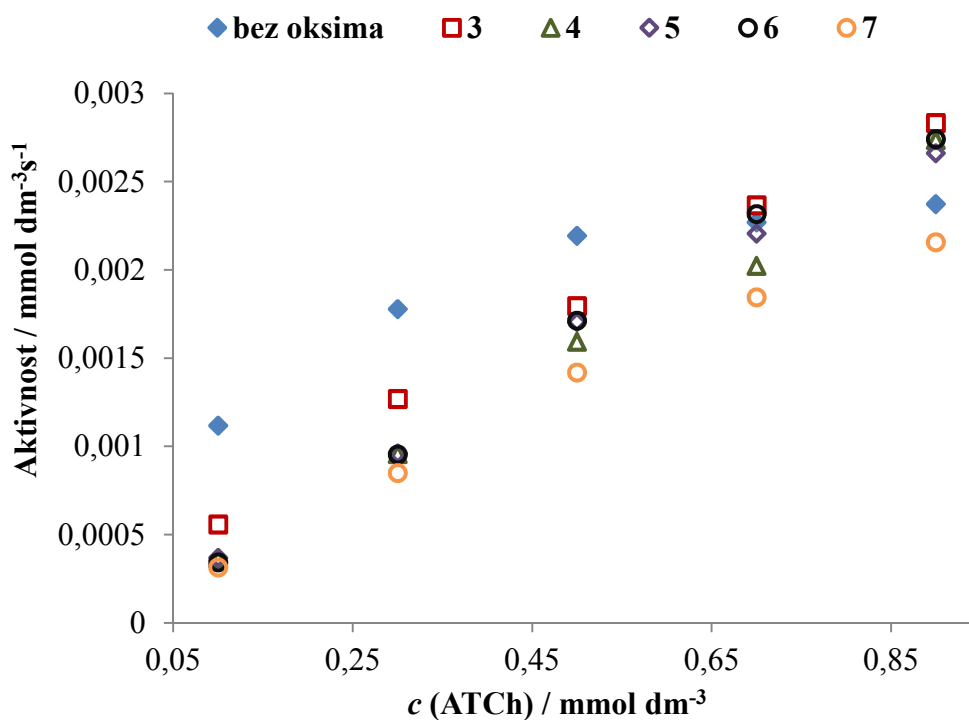
Priprava spojeva **8** i **9** provedena je reakcijom D-fruktoze i D-riboze s hidroksilamin-hidrokloridom u metanolu (shema 14). Reakcija je primjer priprave oksima iz karbonilnog spoja (shema 11).



Shema 14. Priprava oksima D-fruktoze i D-riboze.

4.2. INTERAKCIJA OKSIMA S BUTIRILKOLINESTERAZOM IZ LJUDSKOG SERUMA

Reverzibilna inhibicija *HuBChE* oksimima **3-7** koncentracije 1 mmol dm^{-3} mjerena je pri rasponu koncentracija ATCh od $0,1$ do $0,9 \text{ mmol dm}^{-3}$, a za oksime **8** i **9** koncentracije 12 mmol dm^{-3} pri koncentraciji ATCh $0,9 \text{ mmol dm}^{-3}$. Na slici 13 prikazana je aktivnost *HuBChE* pri različitim koncentracijama supstrata za reakciju bez oksima i za reakcije s oksimima **3-7**. Pri većim koncentracijama supstrata dolazi do aktivacije enzima oksimima **3-6**, **8** i **9** (tablica 3.).



Slika 13. Aktivnost *HuBChE* u reakciji bez oksima i s oksimima **3-7** o koncentraciji ATCh u rasponu od $0,1$ do $0,9 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Tablica 3. Usporedba aktivnosti *HuBChE* bez oksima i s oksimima **3-9** pri različitim koncentracijama supstrata.

OKSIM	$c(\text{ATCh}) / \text{mmol dm}^{-3}$					Inhibicija / %
	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	
3	50,13	28,59	18,19	aktivacija	aktivacija	
4	67,34	46,19	27,35	10,82	aktivacija	
5	66,96	46,03	22,22	2,78	aktivacija	
6	69,25	46,27	21,89	aktivacija	aktivacija	
7	71,81	52,21	35,28	18,67	9,08	
8	-	-	-	-	aktivacija	
9	-	-	-	-	aktivacija	

Utjecaj oksima **3-7** na brzinu hidrolize ATCh pri nižim i višim koncentracijama ATCh je različit. Kod viših koncentracija ATCh brzina hidrolize veća je u prisutnosti oksima dok pri nižim koncentracijama ATCh oksimi pokazuju inhibitorno djelovanje.

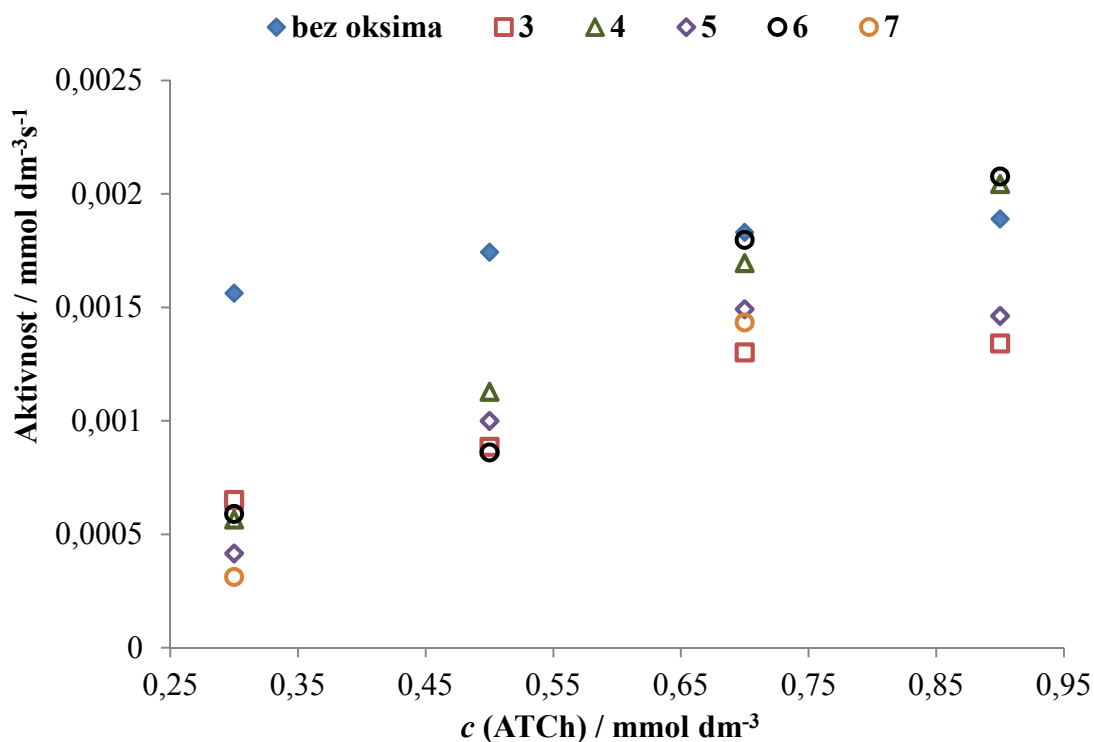
Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti da se kvaterni derivati imidazol-2-aldoksima vežu u aktivno, ali i alosteričko mjesto enzima. Pri nižim koncentracijama supstrata oksim se natječe sa supstratom u vezanju za aktivno mjesto što rezultira inhibicijom enzima (od 30 do 70%). Pri višim koncentracijama supstrata manje oksima se natječe sa supstratom za aktivno mjesto enzima pa postaje izraženiji učinak vezanja oksima na alosteričko mjesto enzima čime se isti aktivira.

Najjačim inhibitorom enzima pokazao se oksim **7**, a najslabijim oksim **3**. Oksim **7** je jedini koji ni pri koncentraciji ATCh $0,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ nije izazvao aktivaciju enzima. Međutim, temeljem sustavnog smanjenja postotka inhibicije vidljivo je da u prisutnosti oksima **7** postoji efekt aktivacije.

Oksimi monosaharida ne inhibiraju enzim već ga aktiviraju. Također je potrebna puno veća koncentracija tih oksima (12 puta veća koncentracija) kako bi efekt aktivacije koji izazivaju bio usporediv s efektom kvaternih derivata imidazol-2-aldoksima.

4.3. INTERAKCIJA OKSIMA S BUTIRILKOLINESTERAZOM IZ SERUMA KUNIĆA

Reverzibilna inhibicija *RSBChE* oksimima **3-7** koncentracije 1 mmol dm^{-3} mjerena je pri rasponu koncentracija *ATCh* od $0,3$ do $0,9 \text{ mmol dm}^{-3}$, a za oksim **9** koncentracije 12 mmol dm^{-3} pri koncentraciji *ATCh* $0,9 \text{ mmol dm}^{-3}$. Na slici 14 prikazana je aktivnost *RSBChE* pri različitim koncentracijama supstrata za reakciju bez oksima i za reakcije s oksimima **3-7**. Pri većim koncentracijama supstrata dolazi do zasićenja enzima supstratom te aktivacije enzima oksimima **4, 6, i 9** (tablica 4.).



Slika 14. Aktivnost *RSBChE* u reakciji bez oksima i s oksimima **3-7** o koncentraciji *ATCh* u rasponu od $0,3$ do $0,9 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Tablica 4. Usporedba aktivnosti *RSBChE* bez oksima i s oksimima **3-7** i **9** pri različitim koncentracijama supstrata.

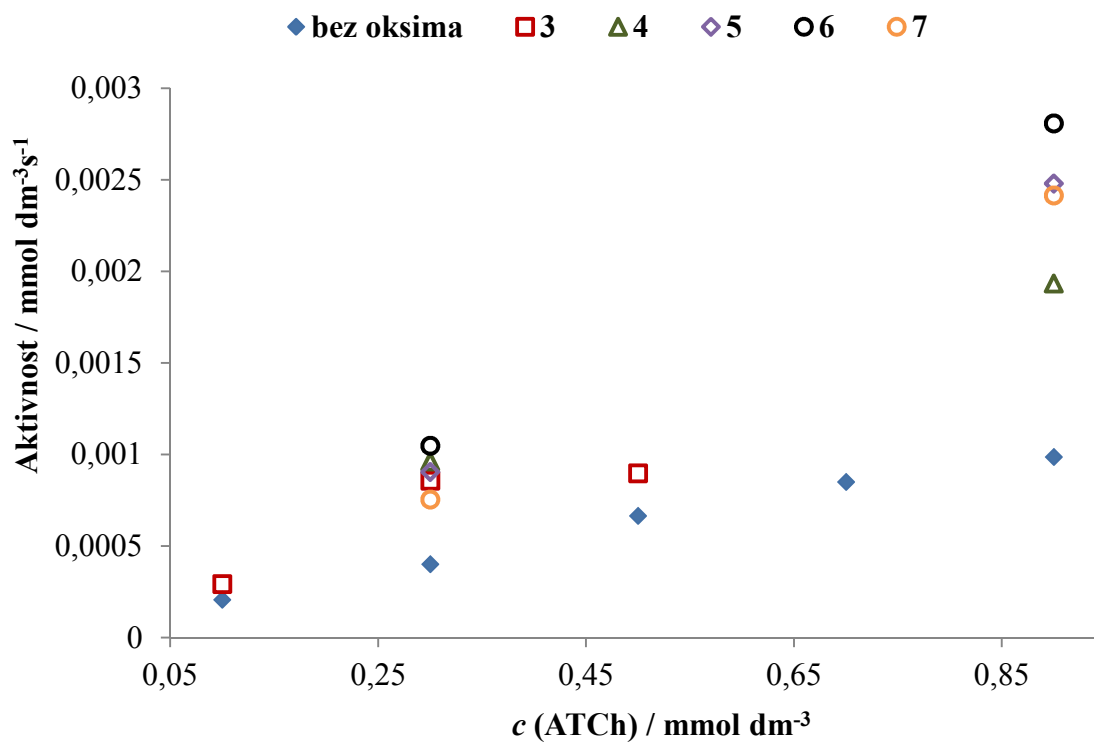
OKSIM	$c(\text{ATCh}) / \text{mmol dm}^{-3}$				Inhibicija / %
	0,3	0,5	0,7	0,9	
3	58,31	49,22	28,89	29,04	
4	63,6	34,84	6,71	aktivacija	
5	73,2	42,23	17,89	22,11	
6	61,92	50,26	1,05	aktivacija	
7	79,83	-	21,08	-	
9	-	-	-	aktivacija	

Interakcija oksima **3-7** s *RSBChE* slična je onoj s *HuBChE*. Pri manjim koncentracijama supstrata ATCh dolazi do inhibicije enzima oksimima, koja se prema većim koncentracijama ATCh sustavno smanjuje, odnosno prelazi u aktivaciju. Najjačim inhibitorima pokazali su se oksimi **7**, **5** i **3**, a najslabijim oksim **6**. Oksimi **3** i **5** ne uzrokuju aktivaciju enzima pri koncentraciji supstrata od $0,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ kao oksimi **4** i **6**, no iz trenda smanjenja inhibicije moguće je zaključiti da dolazi do takvog nizanjanja koje rezultira aktivacijom. Oksimi monosaharida ne inhibiraju ni *RSBChE* već ga aktiviraju.

Usporedbom podataka u tablicama 3 i 4 može se zaključiti da je kod *RSBChE* manje izražen efekt aktivacije pri većim koncentracijama supstrata za oksime **3** i **5**.

4.4. INTERAKCIJA OKSIMA S BUTIRILKOLINESTERAZOM IZ SERUMA KONJA

Interakcija *EqBChE* s oksimima **3-7** koncentracije 1 mmol dm^{-3} mjerena je pri koncentracijama ATCh $0,3$ i $0,9 \text{ mmol dm}^{-3}$, a za oksime **8** i **9** koncentracije 12 mmol dm^{-3} pri koncentraciji ATCh $0,9 \text{ mmol dm}^{-3}$. Na slici 15 prikazana je aktivnost *EqBChE* pri različitim koncentracijama supstrata za reakciju bez oksima i za reakcije s oksimima **3-7**. Pri svim koncentracijama supstrata opažena je aktivacija enzima oksimima **3-9**.



Slika 15. Aktivnost *EqBChE* u reakciji bez oksima i s oksimima **3-7** o koncentraciji ATCh pri 0,3 i 0,9 mmol dm^{-3} .

Svi sintetizirani oksimi pokazali su aktivacijski utjecaj na *EqBChE* i pri nižim i pri višim koncentracijama ATCh. Kako je pri manjoj koncentraciji ATCh opažena manja aktivacija, može se zaključiti da se oksimi **3-7** također natječu sa supstratom i u aktivnom mjestu enzima.

5. ZAKLJUČCI

Sintetizirani su oksimi: 2-hidroksiiminometil-*N,N*-dimetilimidazolijev jodid (**3**), 2-hidroksiiminometil-3-metil-1-(*p*-nitrobenzil)-imidazolijev bromid (**4**), 2-hidroksiiminometil-1-(*m*-klorbenzil)-3-metilimidazolijev bromid (**5**), 2-hidroksiiminometil-1-(*p*-brombenzil)-3-metilimidazolijev bromid (**6**), 2-hidroksiiminometil-1-(*m*-metilbenzil)-3-metilimidazolijev bromid (**7**), D-fruktoza-oksime (**8**), D-riboza-oksime (**9**); te potvrđeni IR, ^1H i ^{13}C NMR spektroskopskom analizom.

UV/VIS spektrofotometrijom određena je interakcija navedenih oksima s butirilkolinesterazom iz seruma čovjeka i kunića te liofiliziranom butirilkolinesterazom iz seruma konja.

Kvaterni derivati imidazol-2-aldoksima inhibiraju enzime iz seruma čovjeka i kunića pri nižim koncentracijama supstrata, a aktiviraju pri višim koncentracijama supstrata.

Oksimi monosaharida ne inhibiraju testirane enzime već je uočen efekt aktivacije pri najvećoj testiranoj koncentraciji supstrata.

Butirilkolinesteraza liofilizirana iz seruma konja aktivirana je svim sintetiziranim oksimima i pri nižim i pri višim koncentracijama supstrata.

Razlike u inhibicijama pripremljenih oksima s butirilkolinesterazama iz različitih organizama mogu pomoći u razumijevanju načina vezanja u alosteričko mjesto enzima.

6. LITERATURA

- [1] R. T. Delfino, T. S. Ribeiro, J. D. Figueroa-Villar, *J. Braz. Chem. Soc.* **20** (2009) 407-428.
- [2] I. Primožič, S. Tomić, *Kem. Ind.* **53** (2004) 401-409.
- [3] H. Thiermann, K. Kehe, D. Steinritz, J. Mikler, I. Hill, T. Zilker, P. Eyer, F. Worek, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **58** (2007) 359-366.
- [4] R. Odžak, S. Tomić, H. Čičak, Z. Mihalić, B. Prugovečki, D. Matković-Čalogović, *Struct. Chem.* **17** (2006) 337-346.
- [5] G. E. Garcia, A. J. Campbella, J. Olsona, D. Moorad-Doctora, V. I. Morthole *Chemico-Biological Interactions* **187** (2010) 191-198.
- [6] E. Giacobini, *Pharmacol. Res.* **50** (2004) 433-440.
- [7] D. M. Quinn, *Chem. Rev.* **87** (1987) 955-975.
- [8] H. Soreq, S. Seidman, *Nat. Rev. Neurosci.* **2** (2001) 294-302.
- [9] P. Taylor, Z. Radić, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34** (1994) 281-320.
- [10] M. Schumacher, S. Camp, Y. Maulet, M. Newton, K. McPhee-Quigley, S. S. Taylor, T. Friedmann, P. Taylor, *Nature* **319** (1986) 407-409.
- [11] P. Taylor, *J. Biol. Chem* **266** (1991) 4025.
- [12] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **253** (1991) 872-879.
- [13] P. H. Axelsen, M. Harel, I. Silman, J. L. Sussman, *Protein Sci.* **3** (1994) 188-197.
- [14] M. Fuxreiter, A. Warshel, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 183-194.
- [15] A. S. Gonçalves, T. C. C. França, A. Wilter, J. D. Figueroa-Villar, *J. Braz. Chem. Soc.* **17** (2006) 968-975.
- [16] Z. Radić, E. Reiner, P. Taylor, *Mol. Pharmacol.* **39** (1991) 98-104.

- [17] I. Silman, J. L. Sussman, *Chem. –Biol. Interact.* **175** (2008) 3-10.
- [18] P. Masson, M. -T. Froment, E. Gillon, F. Nachon, O. Lockridge, L. M. Schopfer, *Biochim. Biophys. Acta* **1774** (2007) 16-34.
- [19] A. Shafferman, D. Barak, D. Kaplan, D. Ordentlich, C. Kronman, B. Velan, *Chem.-Biol. Interact.* **157-158** (2005) 123-131.
- [20] M. Harel, D. M. Quinn, H. K. Nair, I. Silman, J. L. Sussman, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 2340-2346.
- [21] D. C. Vellom, Z. Radić, Y. Li, N. A. Pickering, S. Camp, P. Taylor, *Biochemistry* **32** (1993) 12-17.
- [22] Z. Kovarik, A. Bosak, G. Šinko, T. Latas, *Croat. Chem. Acta* **76** (2003) 63-67.
- [23] Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 41141-41147.
- [24] M. A. Sogorb, E. Vilanova, V. Carrera, *Toxicol. Lett.* **151** (2004) 219-233.
- [25] F. Worek, M. Koller, H. Thiermann, L. Szinicz, *Toxicology* **214** (2005) 182-189.
- [26] R. C. Gupta, *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*; R. C. Gupta, ed., 1sted., Elsevier Academic Press: London (2006) 5-24.
- [29] B. P. Doctor, A. Saxena, *Chem.Biol. Interact.* **167** (2005) 157-158.
- [28] D. E. Lenz, D. Yeung, J. R. Smith, R. E. Sweeney, L. A. Lumley, D. M. Cerasoli, *Toxicology* **233** (2007) 31-39.
- [29] T. Evron, B. C. Geyer, I. Cherni, M. Muralitharan, J. Kilbourne, S. P. Fletcher, H. Soreq, T. S. Mor, *FASEB J.* **21** (2007) 2961-2969.
- [30] Y. J. Huang, Yl. Huang, H. Baldassarre, B. Wang, A. Lazaris, M. Leduc, A. S. Bilodeau, A. Bellemare, M. Côté, P. Herskovits, M. Touati, C. Turcotte, L. Valeanu, N. Lemée, H. Wilgus, I. Bégin, B. Bhatia, K. Rao, N. Neveu, E. Brochu, J. Pierson, D. K. Hockley, D. M. Cerasoli, D. E. Lenz, C. N. Karatzas, S. Langermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **104** (2007) 13603-13608.
- [31] D. Rochu, E. Chabrière, P. Masson *Toxicology* **233** (2007) 47-59.

- [32] S. M. Somani, R. P. Solana, Dube, S. N. *In Chemical Warfare Agents*; Academic Press Inc., San Diego, 1992, 68-123.
- [33] Sidell, F. R. *In Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare-Textbook of Military Medicine*; Office of the Surgeon General, US Army: Washington D.C., 1997, 129-179.
- [34] K. Cannard *J. Neurol. Sci.* **249** (2006) 86-94.
- [35] McDonough, J. H.; Shih, T.-M. *In Chemical Warfare Agents-Toxicology and Treatment*; 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, 2007, 287-303.
- [36] E. Reiner, et al. / *Arh Hig Rada Toksikol* **58** (2007) 329-338.
- [37] E. Buncl, C. Cannes, A. P. Chatrousse, F. Terrier, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 8766-8767.
- [38] F. Terrier, P. Rodriguez - DaFonte, E. Le Guével, G. Moutiers, *Org. Biomol. Chem.* **4** (2006) 4352-4363.
- [39] M. Maksimović, B. Bošković, B. Radović, Lj. Tadić, V. Deljac, Z. Binenfeld, *Acta Pharm. Jugosl.* **30** (1980) 151-160.
- [40] M. Grifantini, S. Martelli, M. L. Stein *J. Pharm. Sci.* **61** (1972) 631-633.
- [41] C. D. Bedford, R. N. Haris, R. A. Howd, D. A. Goff, G. A. Koolpe, M. Petesch, I. Koplovitz, W. E. Sultan, H. A. Musallam, *J. Med. Chem.* **32** (1989) 504-516.
- [42] R. K. Bansal, *Heterocyclic Chemistry*, New Age Int. Pub., New Delhi 1999, pp. 389-440.
- [43] M. Mesić, V. Deljac, A. Deljac, Z. Binenfeld, M. Maksimović, V. Kilibarda, V. Kovačević, *Acta. Pharm. Jugosl.* **41** (1991) 203-210.
- [44] K. Hofmann, *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Interscience Publishers Inc., New York 1953, pp. 3-26.
- [45] J. F. Robyt, *Essentials of Carbohydrate Chemistry*, Springer-Verlag, New York, 1998, pp. 262-287.
- [46] P. Franchetti, M. Grifantini, S. Martelli, M. L. Stein, *J. Med. Chem.* **17** (1974) 18-22.

- [47] C.D. Bedford, R.N.Haris, III, R.A.Howd, A.Miller, H.W.Nolen, III, R.A.Kenley, *J.Med.Chem.* **27** (1984) 1431-1438.
- [48] C. D. Bedford, R. N. Harris, R. A. Howd, D. A. Goff, G. A. Koolpe, M. Petesch, A. Miller, H. W. Nolen, H. A. Musallam, R. O. Pick, D. E. Jones, I. Kolpovitz, W. E. Sultan *J.Med.Chem.* **32** (1989) 493-502.
- [49] D. A. Goff, G. A. Koolpe, A. B. Kelson, H. M. Vu, D. L. Taylor, C. D. Bedford, H. A. Musallam, I. Koplovitz, R. N. Haris, *J.Med.Chem.* **34** (1991) 1363-1368.
- [50] G. A. Koolpe, S. M. Lovejoy, D. A. Goff, K. Lin, D. S. Leung, C. D. Bedford, H. A. Musallam, I. Koplovitz, R. N. Haris, *J.Med.Chem.* **34** (1991) 1368-1376.
- [51] A. Galoši, V. Deljac, A. Deljac, Z. Binenfeld, M. Maksimović, *Acta. Pharm. Jugosl.* **38** (1988) 23-29.
- [52] J. R. Sharpley, *Inorganic Synthesis*, John Wiley & Sons, New Jersey 2004, 31-32.
- [53] P. Finch, Z. Merchant, *J. C. S. Perkin* **1** (1975) 1682-1686.
- [54] J. Brand, T. Huhn, U. Groth, J. C. Jochims, *Chemistry* **12** (2006) 499-509.
- [55] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr., R. M. Featherstone, *Biochem Pharmacol.* **7** (1961) 88-95.
- [56] W. N. Aldrige, E. Reiner, *Enzyme Inhibitors as Substrates: Interaction of Esterases with Esters of Organophosphorus and carbamatic Acids*, North Holland, Amsterdam, 1972.
- [57] R. K. Bansal, *Heterocyclic Chemistry*, New Age Int. Pub., New Delhi 1999, 389-440.
- [58] Elango, R. Srirambalaji, G. Anantharaman, *Tetrahedron Letters* **48** (2007) 9059-9062.

SAŽETAK

Sandro Makarić i Sara Morasi Piperčić

PRIPRAVA OKSIMA IMIDAZOLA I MONOSAHARIDA TE NJIHOVE INTERAKCIJE S BUTIRILKOLINESTERAZAMA

U okviru ovog rada sintetizirani su oksimi monosaharida (D-riboze i D-fruktoze) te kvaterni derivati imidazol-2-aldoksima s različito supstituiranim *N*-benzilnim skupinama te su određene njihove interakcije s butirilkolinesterazom iz seruma različitih organizama.

Oksimi monosaharida pripremljeni su iz odgovarajuće aldoze/ketoze uz hidroksilamin-hidroklorid standardnim postupkom. Komercijalno dostupan *N*-metilimidazol modificiranom Iversen-Lundovom metodom preveden je u *N*-metilimidazol-2-karbaldehid te zatim u odgovarajući aldoksim. Kvaternizacija tako priređenog aldoksima s *meta*- i *para*-supstituiranim benzil-bromidima rezultirala je željenim *N*-kvaternim derivatima. Strukturna svojstva pripremljenih spojeva proučavana su IR, ^1H i ^{13}C NMR spektroskopskim metodama. Optička čistoća oksima monosaharida određena je optičkim skretanjem.

UV/VIS spektrofotometrijom mjerena je aktivnost BChE iz seruma čovjeka i kunića te liofilizirane BChE izolirane iz seruma konja bez oksima te uz prisutnost svakog od pripremljenih oksima. Kvaterni derivati imidazol-2-aldoksima pokazali su se inhibitorima BChE iz seruma čovjeka i kunića pri nižim koncentracijama supstrata, a aktivatorima pri višim testiranim koncentracijama supstrata dok su oksimi monosaharida aktivirali BChE iz seruma čovjeka i kunića. Svi sintetizirani oksimi pokazali su se aktivatorima BChE izolirane iz seruma konja.

KLJUČNE RIJEČI: oksimi monosaharida, kvaterni derivati imidazol-2-aldoksima, butirilkolinesteraza, inhibicija, aktivacija

ABSTRACT

Sandro Makarić & Sara Morasi Piperčić

SYNTHESIS OF IMIDAZOLIUM AND MONOSACCHARIDE OXIMES AND THEIR INTERACTIONS WITH BUTYRYLCHOLINESTERASES

The aim of this work was to synthesize pure D-ribose- and D-fructose oximes as well as *N*-quaternary substituted benzyl imidazole-2-aldoxime derivatives and to determine interactions with butyrylcholinesterase from different organisms.

Monosaccharide oximes were prepared from the corresponding aldose/ketose with hydroxylamine hydrochloride by using the standard procedure. Commercially available *N*-methylimidazole was converted to the appropriate *N*-methylimidazole-2-carbaldehyde by using the modified Ivesen-Lund method. Quaternization of the prepared imidazole-2-aldoxime with *meta*- and *para*- substituted benzyl bromides gave the desired *N*-benzyl derivatives. Structural properties of the prepared compounds were studied by IR, ¹H and ¹³C NMR spectroscopies. The optical purity of chiral compounds was determined by optical rotation.

UV/VIS spectroscopy was used to measure activity of human, rabbit and equine BChE in the presence and out of all prepared oximes. Quaternary imidazole-2-aldoxime derivatives inhibit *Hu*BChE and *RS*BChE at lower concentration while activation occurs at higher substrate concentrations. Monosaccharide oximes have shown only activation at all substrate concentrations. All the prepared oximes have been proven to be activators of lyophilized *Eq*BChE.

KEY WORDS: monosaccharide oximes, *N*-quaternary imidazole-2-aldoxime derivatives, BChE, inhibition, activation

ŽIVOTOPISI

SANDRO MAKARIĆ

OBRAZOVANJE:

- 2003.- 2007. Prirodoslovna škola Vladimira Preloga Zagreb, smjer: Kemijski tehničar – Opći. Sva četiri razreda završena s odličnim uspjehom te maturirao s odličnim uspjehom
- 2007. upisan preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu
- 2010. završen preddiplomski studij kemije; stečena titula prvostupnika kemije (Završni rad pod naslovom „Aromatski spojevi“ izrađen na Zavodu za organsku kemiju, pod mentorstvom prof. dr. sc. Hrvoj Vančika)
- 2010. upisan diplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, smjer: istraživački, grana: organska i analitička kemija
- 2011. upisana druga godina diplomskog studija kemije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, rad na projektu za rektorovu nagradu

STRANI JEZICI:

- engleski jezik

DOSTIGNUĆA:

- 2007. osvojeno drugo mjesto na državnom natjecanju Grand Prix Chimique održanom u Rijeci
- direktan upis na Prirodoslovno-matematički fakultet
- 2007. osvojeno drugo mjesto na Europskom natjecanju Grand Prix Chimique održanom u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga u Zagrebu
- 2007./2008. stipendist tvrtke „Ru-Ve“
- 2012. sudjelovanje s posterskim priopćenjem pod naslovom “Priprava novih glikokonjugata imidazol-2-aldoksima“ na IX. Susretu mladih kemijskih inženjera, Zagreb, 16.-17.02.2012.

SARA MORASI PIPERČIĆ

OBRAZOVANJE:

- 2003.- 2007. I. Gimnazija Varaždin; smjer: opći dvojezični
- 2007. upisan preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu
- 2010. završen preddiplomski studij kemije; stečena titula prvostupnika kemije (Završni rad pod naslovom „Stereokemija monosaharida“ izrađen na Zavodu za organsku kemiju, pod mentorstvom doc. dr. sc. Vesne Petrović Peroković)
- 2010. upisan diplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu; smjer: istraživački; grana: anorganska i organska kemija
- 2011. upisana druga godina diplomskog studija kemije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, rad na projektu za rektorovu nagradu

STRANI JEZICI:

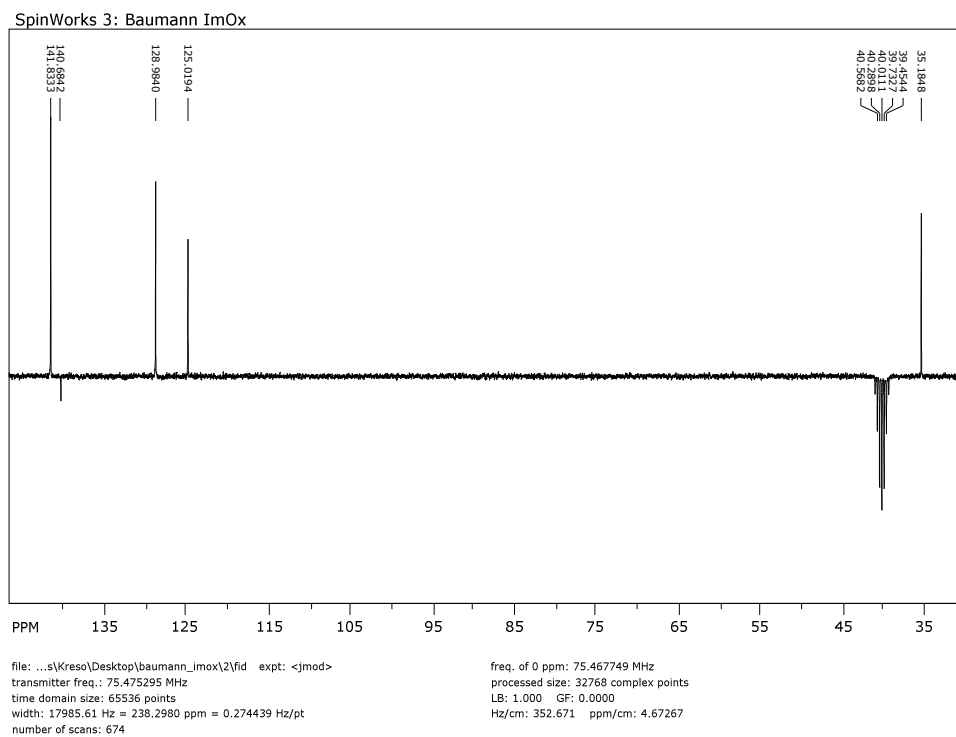
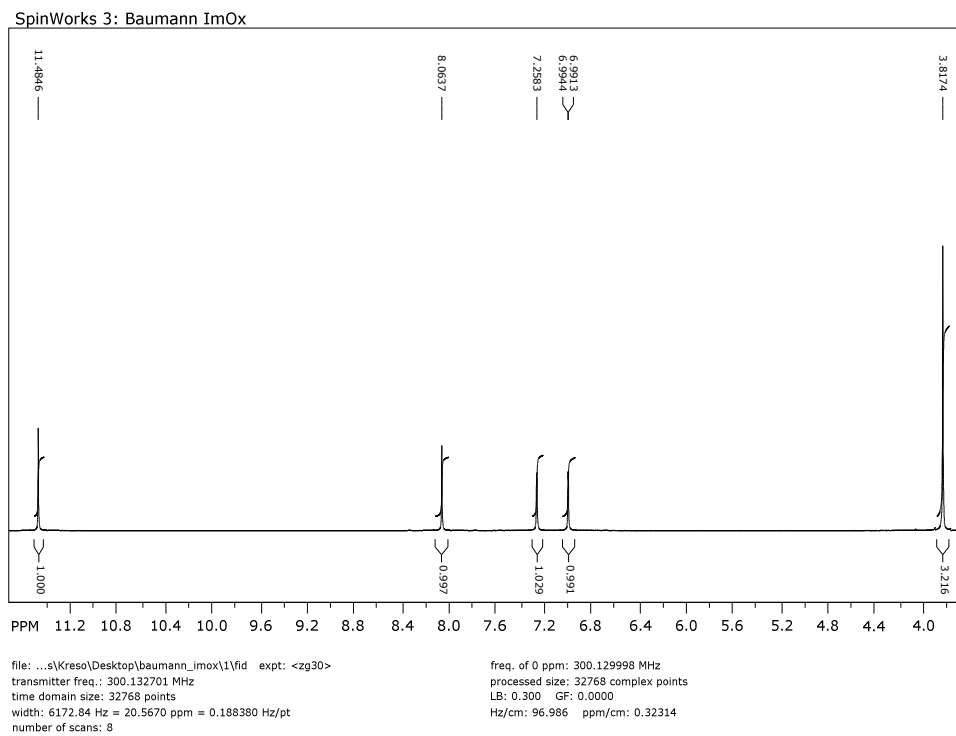
- engleski jezik, njemački jezik

DOSTIGNUĆA:

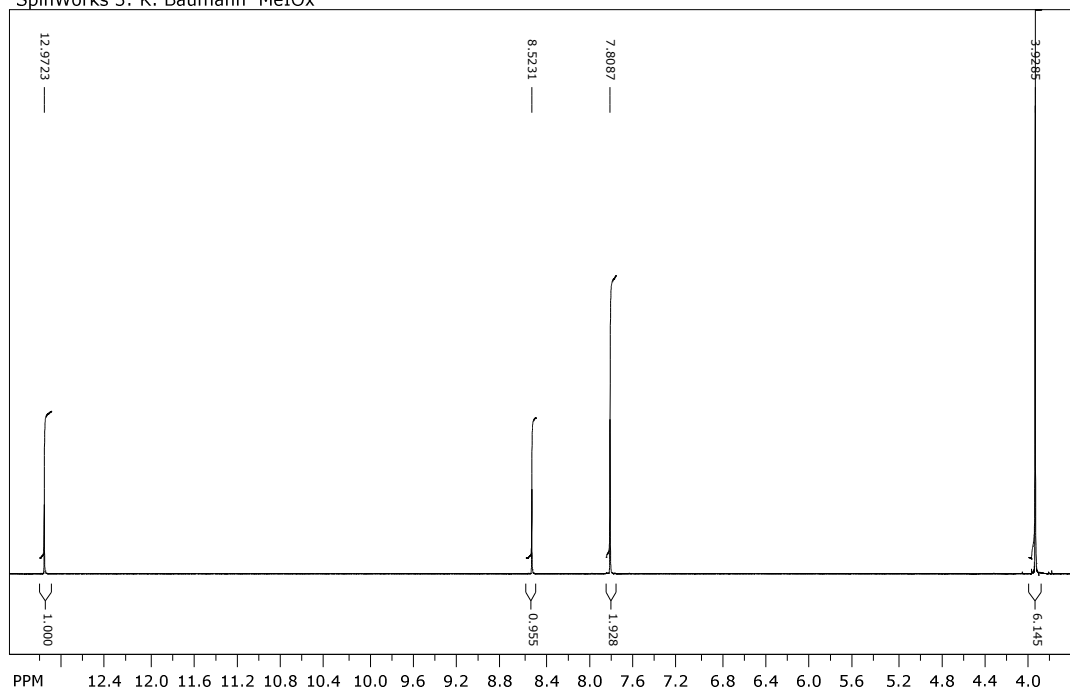
- 2006. i 2007. sudjelovanje na državnom natjecanju iz kemije
- direktan upis na Prirodoslovno-matematički fakultet
- 2007.-2010. državna stipendija A kategorije
- 2011. stipendistica grupe „ADRIS“
- 2012. sudjelovanje s posterskim priopćenjem pod naslovom “Priprava novih glikokonjugata imidazol-2-aldoksima“ na IX. Susretu mladih kemijskih inženjera, Zagreb, 16.-17.02.2012.

DODATCI

1. NMR SPEKTRI SPOJEVA 2-9

Slika D1. ^1H (gore) i ^{13}C (dolje) NMR spektar spoja 2.

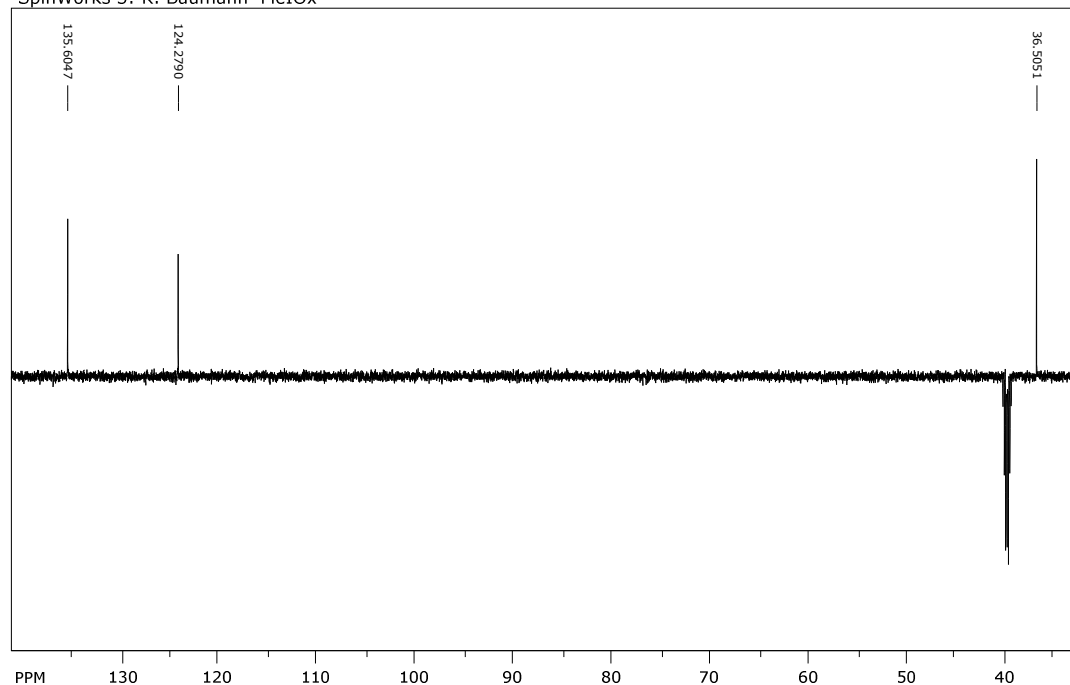
SpinWorks 3: K. Baumann MeIOx



file: ...op\NMR spektri\baumann_meiox\1\fid exp: <zg30>
transmitter freq.: 600.135401 MHz
time domain size: 32768 points
width: 12019.23 Hz = 20.0275 ppm = 0.366798 Hz/pt
number of scans: 32

freq. of 0 ppm: 600.129998 MHz
processed size: 32768 complex points
LB: 0.000 GF: 0.0000
Hz/cm: 234.452 ppm/cm: 0.39066

SpinWorks 3: K. Baumann MeIOx

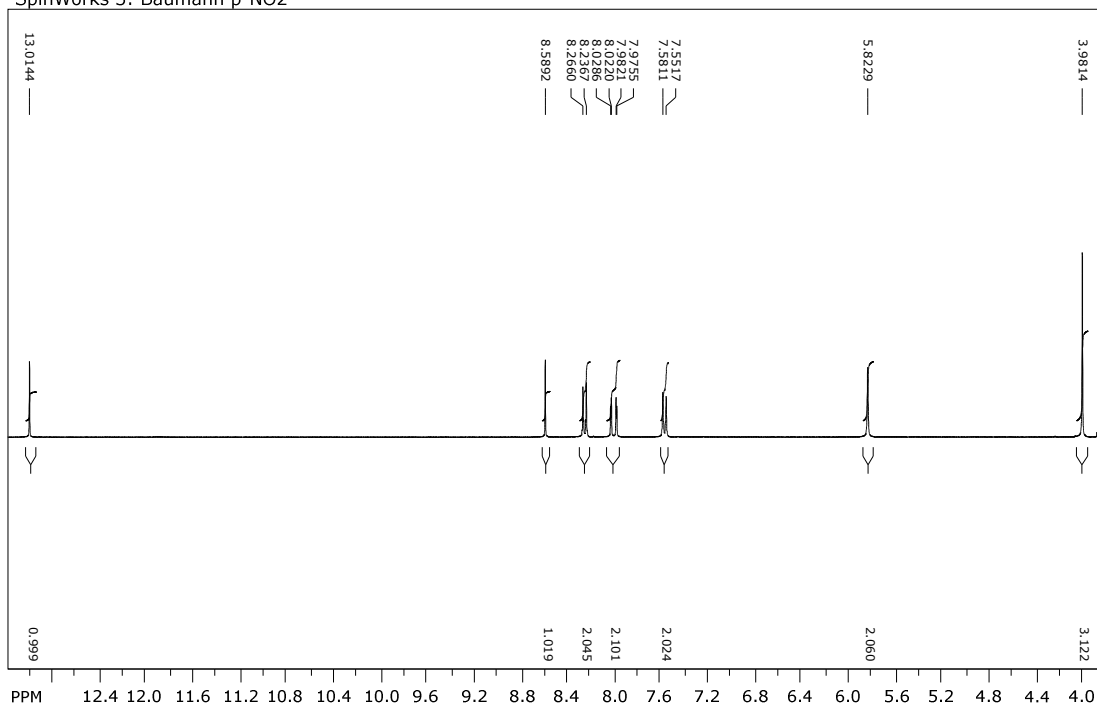


file: ...op\NMR spektri\baumann_meiox\2\fid exp: <jmod>
transmitter freq.: 150.917899 MHz
time domain size: 65536 points
width: 39370.08 Hz = 260.8708 ppm = 0.600740 Hz/pt
number of scans: 2053

freq. of 0 ppm: 150.902884 MHz
processed size: 32768 complex points
LB: 1.000 GF: 0.0000
Hz/cm: 658.067 ppm/cm: 4.36043

Slika D2. ^1H (gore) i ^{13}C (dolje) NMR spektar spoja 3.

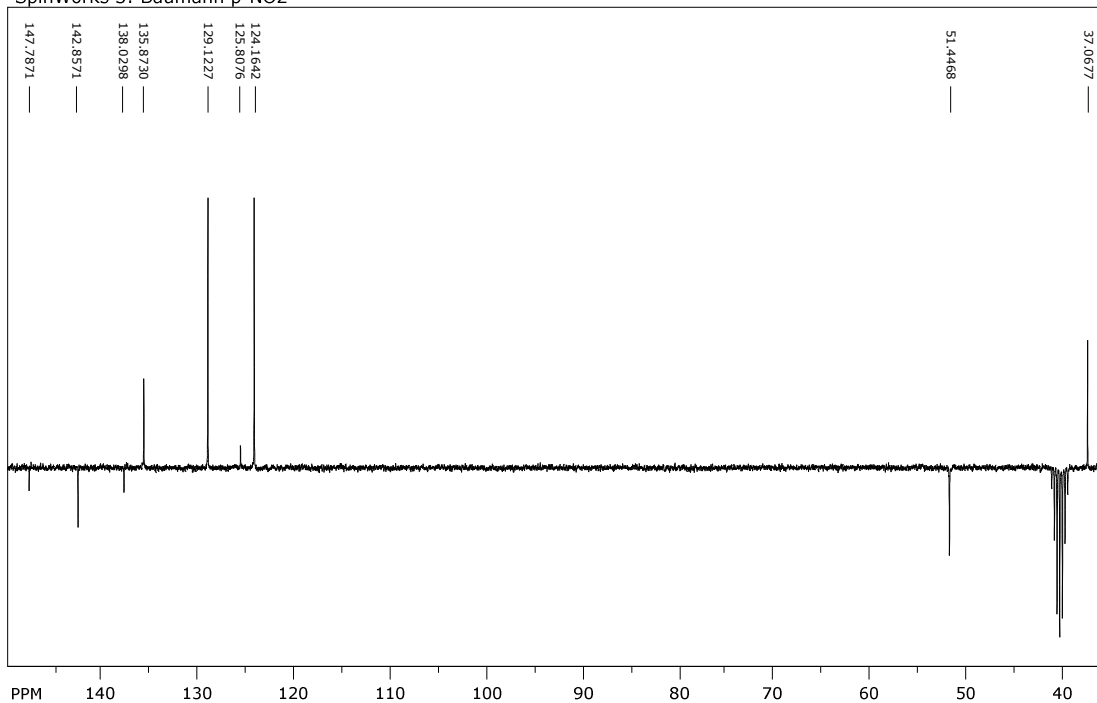
SpinWorks 3: Baumann p-NO2



file: ...ktop\NMR spektri\baumann_pbr\3\fid exp: <zg30>
 transmitter freq.: 300.132701 MHz
 time domain size: 32768 points
 width: 6172.84 Hz = 20.5670 ppm = 0.188380 Hz/pt
 number of scans: 11

freq. of 0 ppm: 300.129998 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 0.300 GF: 0.0000
 Hz/cm: 112.845 ppm/cm: 0.37598

SpinWorks 3: Baumann p-NO2

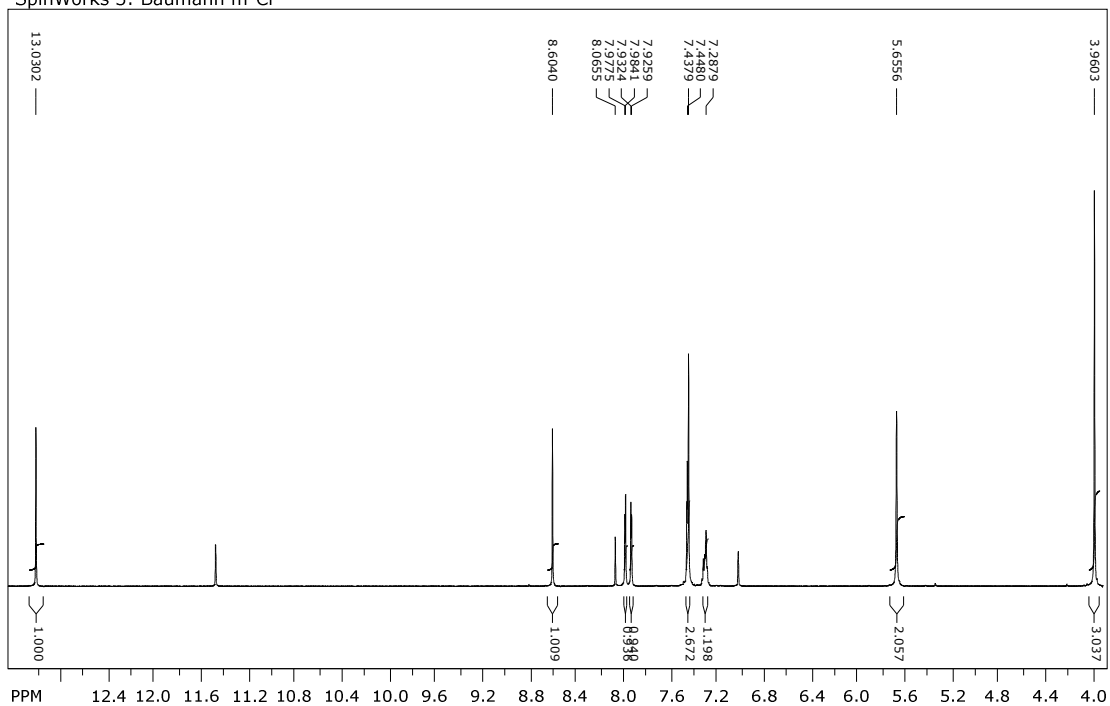


file: ...ktop\NMR spektri\baumann_pbr\4\fid exp: <jmod>
 transmitter freq.: 75.475295 MHz
 time domain size: 65536 points
 width: 17985.61 Hz = 238.2980 ppm = 0.274439 Hz/pt
 number of scans: 1211

freq. of 0 ppm: 75.467749 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 1.000 GF: 0.0000
 Hz/cm: 345.391 ppm/cm: 4.57622

Slika D3. ^1H (gore) i ^{13}C (dolje) NMR spektar spoja 4.

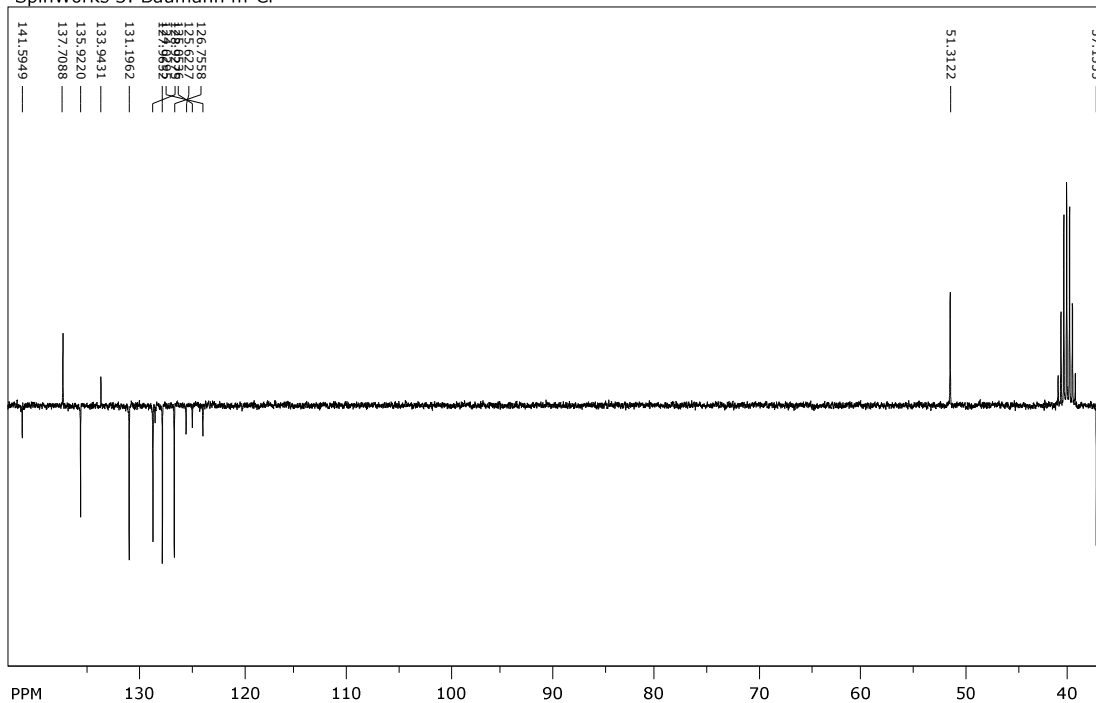
SpinWorks 3: Baumann m-Cl



file: ...ktop\NMR spektri\baumann_pbr\5\fid exp: <zg30>
 transmitter freq.: 300.132701 MHz
 time domain size: 32768 points
 width: 6172.84 Hz = 20.5670 ppm = 0.188380 Hz/pt
 number of scans: 11

freq. of 0 ppm: 300.129998 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 0.300 GF: 0.0000
 Hz/cm: 112.635 ppm/cm: 0.37528

SpinWorks 3: Baumann m-Cl

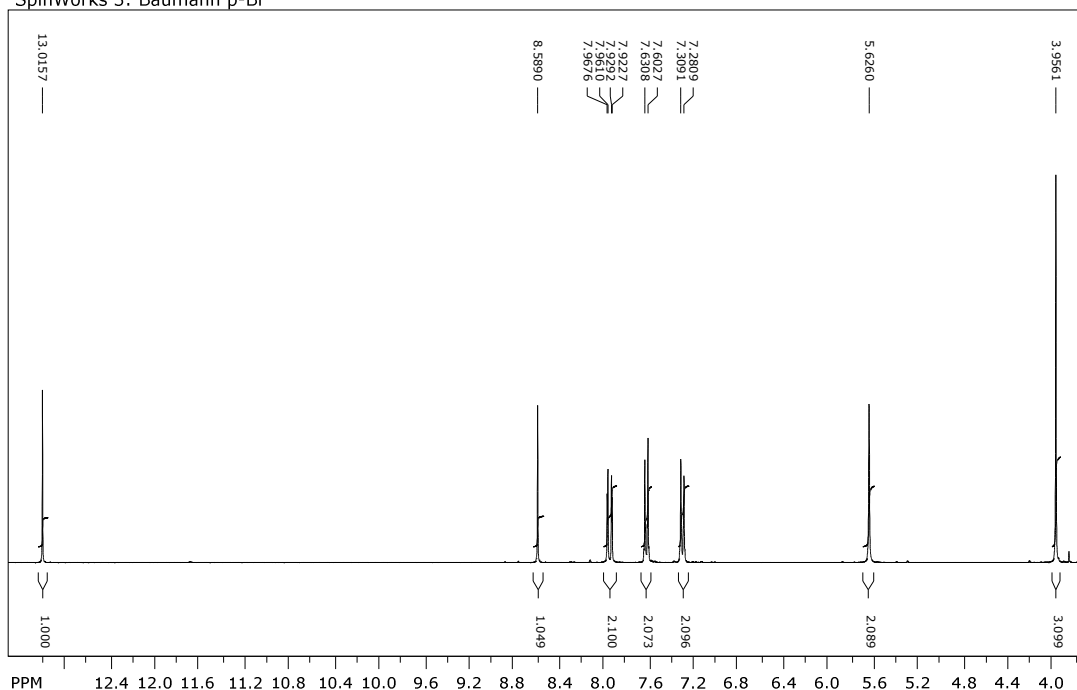


file: ...ktop\NMR spektri\baumann_pbr\6\fid exp: <jmod>
 transmitter freq.: 75.475295 MHz
 time domain size: 65536 points
 width: 17985.61 Hz = 238.2980 ppm = 0.274439 Hz/pt
 number of scans: 1869

freq. of 0 ppm: 75.467749 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 1.000 GF: 0.0000
 Hz/cm: 321.233 ppm/cm: 4.25614

Slika D4. ¹H (gore) i ¹³C (dolje) NMR spektar spoja 5.

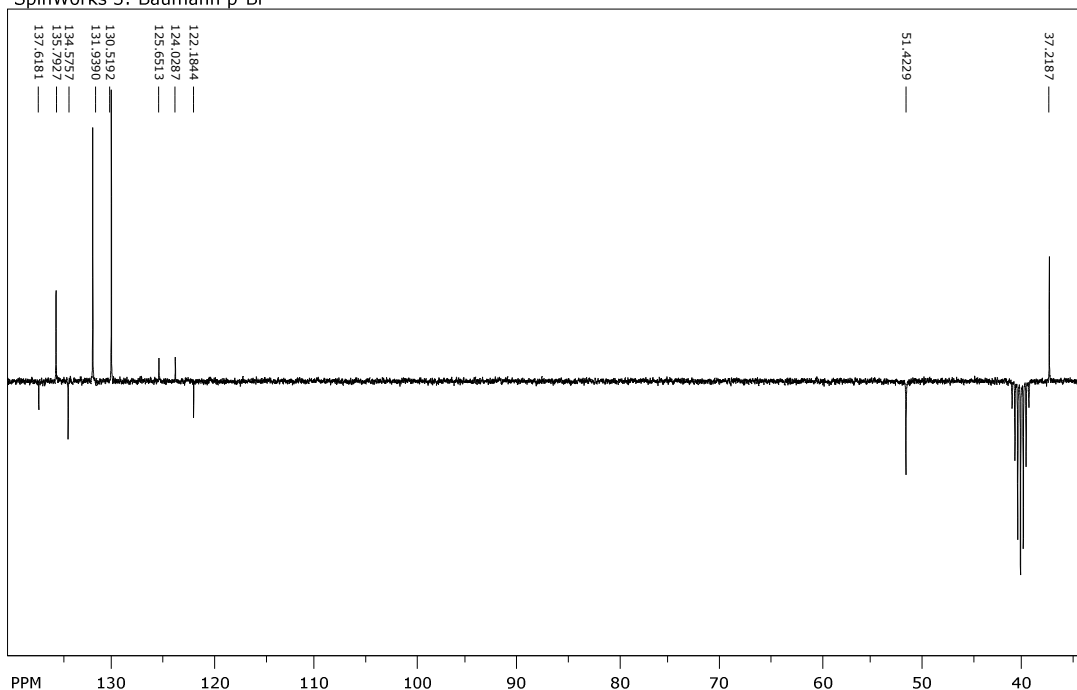
SpinWorks 3: Baumann p-Br



file: ...ktop\NMR spektri\baumann_pbr\1\fid exp: <zg30>
 transmitter freq.: 300.132701 MHz
 time domain size: 32768 points
 width: 6172.84 Hz = 20.5670 ppm = 0.188380 Hz/pt
 number of scans: 12

freq. of 0 ppm: 300.129998 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 0.300 GF: 0.0000
 Hz/cm: 115.156 ppm/cm: 0.38368

SpinWorks 3: Baumann p-Br

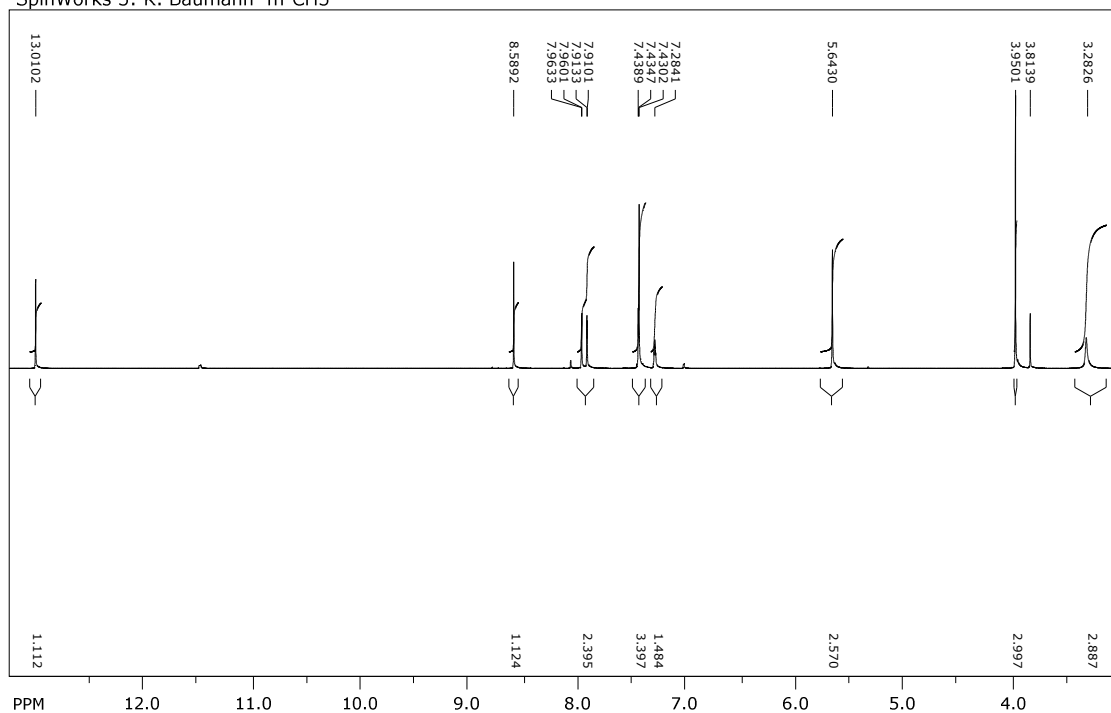


file: ...ktop\NMR spektri\baumann_pbr\2\fid exp: <jmod>
 transmitter freq.: 75.475295 MHz
 time domain size: 65536 points
 width: 17985.61 Hz = 238.2980 ppm = 0.274439 Hz/pt
 number of scans: 1321

freq. of 0 ppm: 75.467749 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 1.000 GF: 0.0000
 Hz/cm: 322.057 ppm/cm: 4.26706

Slika D5. ¹H (gore) i ¹³C (dolje) NMR spektar spoja 6.

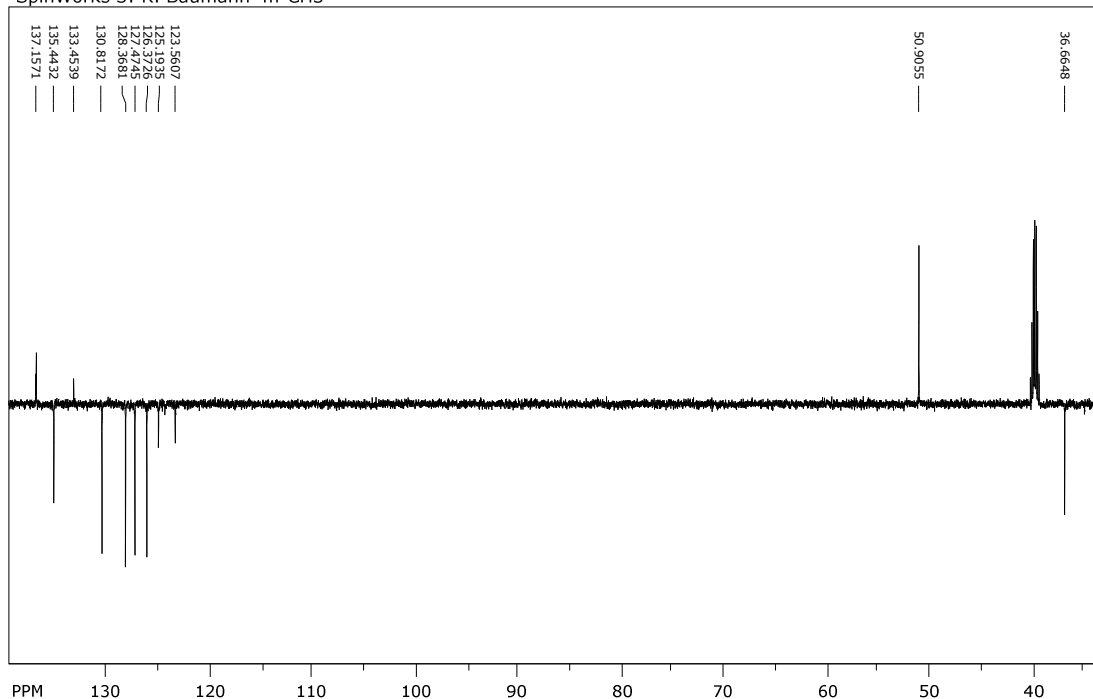
SpinWorks 3: K. Baumann m-CH3



file: ...top\NMR spektri\baumann_mch3\1\fid expt: <zg30>
 transmitter freq.: 600.135401 MHz
 time domain size: 32768 points
 width: 12019.23 Hz = 20.0275 ppm = 0.366798 Hz/pt
 number of scans: 16

freq. of 0 ppm: 600.129999 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 0.000 GF: 0.0000
 Hz/cm: 245.586 ppm/cm: 0.40922

SpinWorks 3: K. Baumann m-CH3

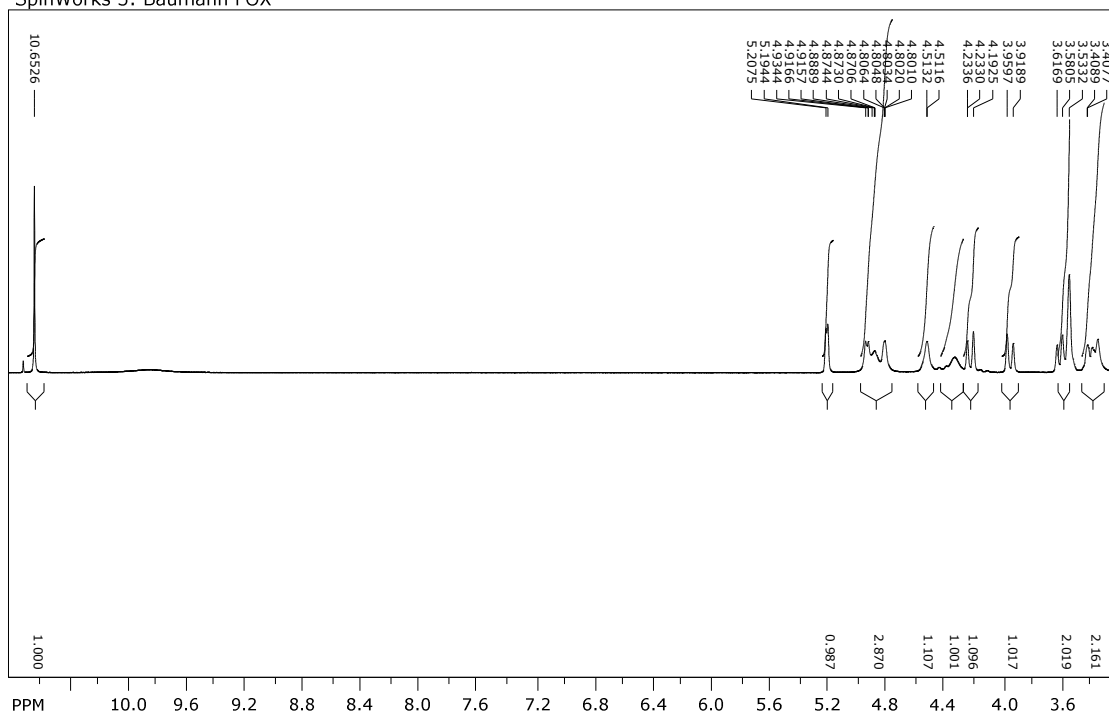


file: ...top\NMR spektri\baumann_mch3\2\fid expt: <jmod>
 transmitter freq.: 150.917899 MHz
 time domain size: 65536 points
 width: 39370.08 Hz = 260.8708 ppm = 0.600740 Hz/pt
 number of scans: 1100

freq. of 0 ppm: 150.902884 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 1.000 GF: 0.0000
 Hz/cm: 643.324 ppm/cm: 4.26274

Slika D6. ^1H (gore) i ^{13}C (dolje) NMR spektar spoja 7.

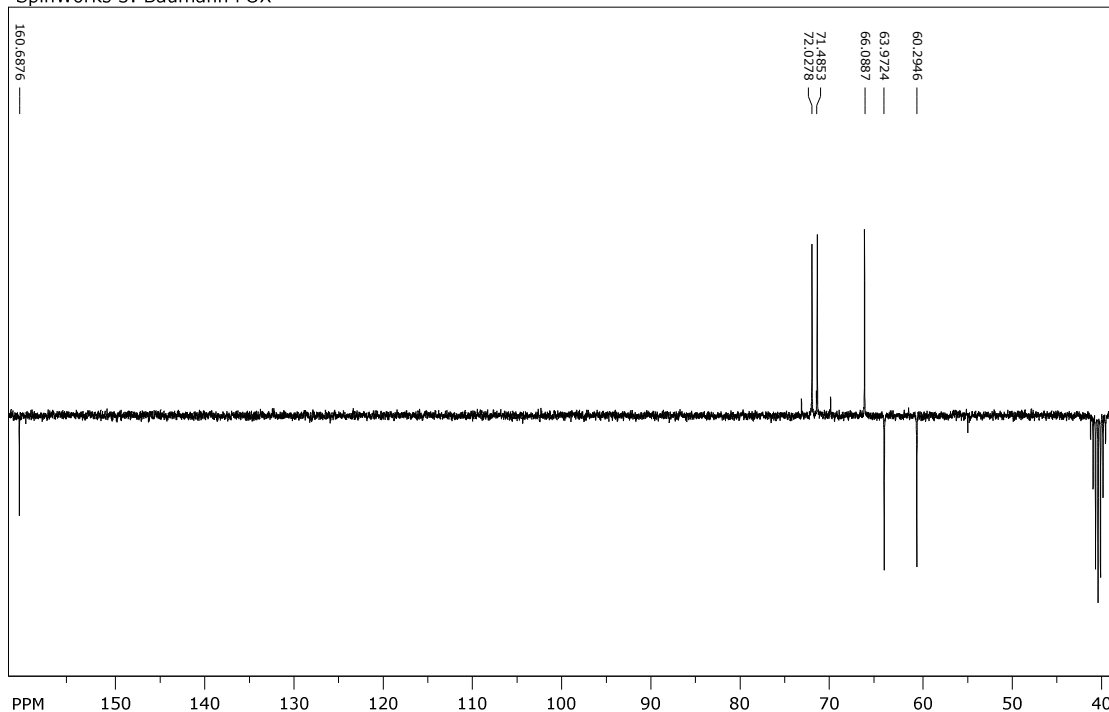
SpinWorks 3: Baumann FOX



file: ...ktop\NMR spektri\baumann_fox\1\fid expt: <zg30>
 transmitter freq.: 300.132701 MHz
 time domain size: 32768 points
 width: 6172.84 Hz = 20.5670 ppm = 0.188380 Hz/pt
 number of scans: 32

freq. of 0 ppm: 300.129998 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 0.000 GF: 0.0000
 Hz/cm: 91.501 ppm/cm: 0.30487

SpinWorks 3: Baumann FOX

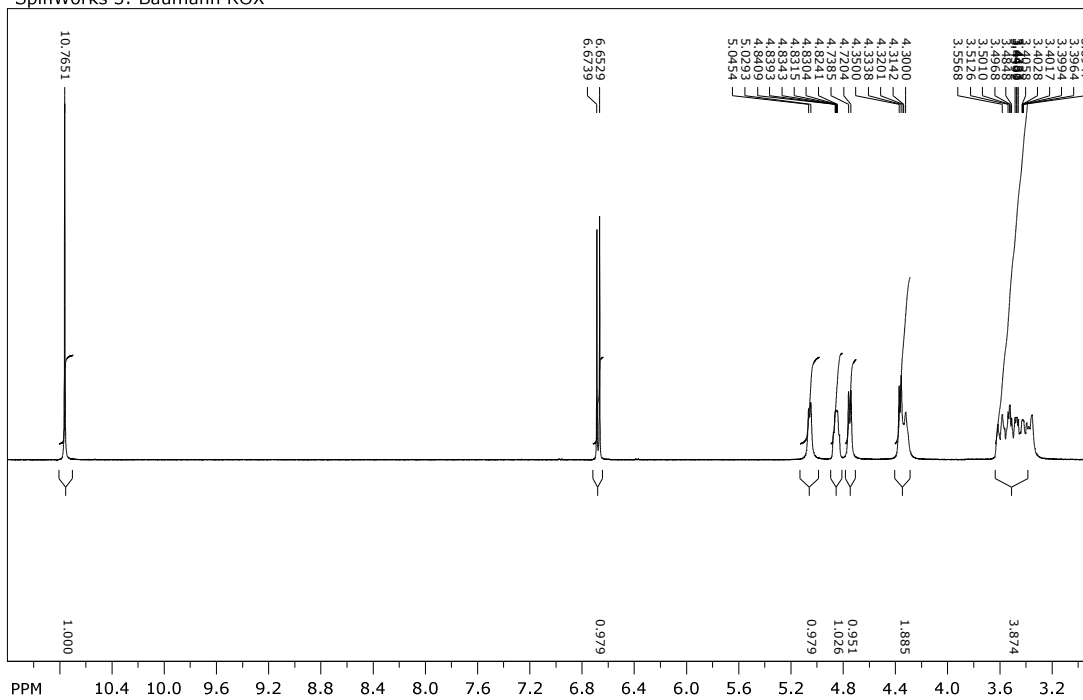


file: ...ktop\NMR spektri\baumann_fox\2\fid expt: <jmod>
 transmitter freq.: 75.475295 MHz
 time domain size: 65536 points
 width: 17985.61 Hz = 238.2980 ppm = 0.274439 Hz/pt
 number of scans: 580

freq. of 0 ppm: 75.467749 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 1.000 GF: 0.0000
 Hz/cm: 375.325 ppm/cm: 4.97282

Slika d7. ^1H (gore) i ^{13}C (dolje) NMR spektar spoja **8**.

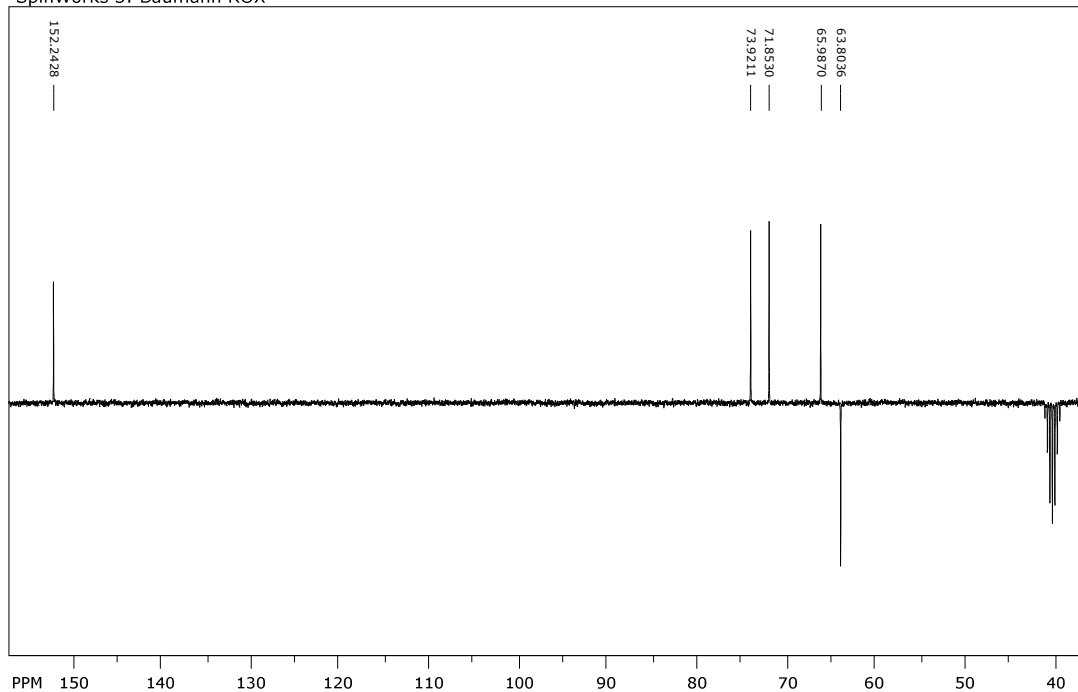
SpinWorks 3: Baumann ROX



file: ...ktop\NMR spektri\baumann_rox\1\fid expt: <zg30>
 transmitter freq.: 300.132701 MHz
 time domain size: 32768 points
 width: 6172.84 Hz = 20.5670 ppm = 0.188380 Hz/pt
 number of scans: 18

freq. of 0 ppm: 300.129998 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 0.000 GF: 0.0000
 Hz/cm: 100.026 ppm/cm: 0.33327

SpinWorks 3: Baumann ROX



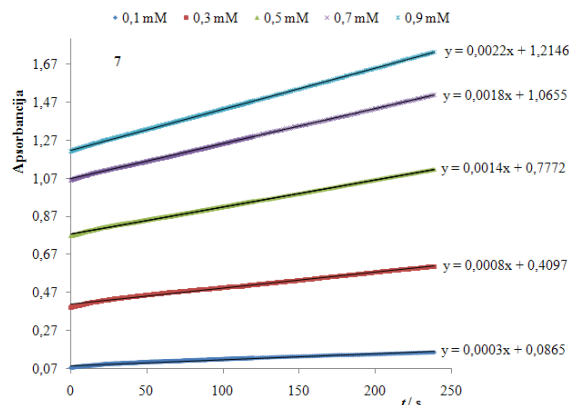
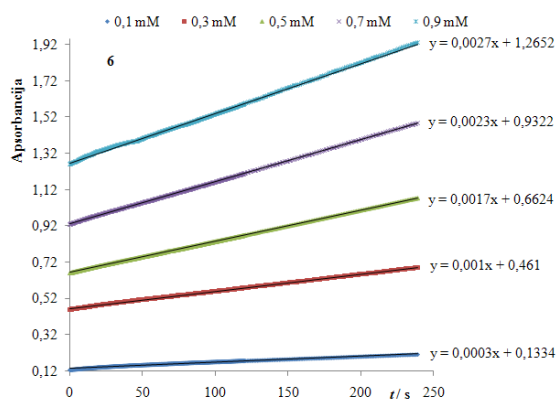
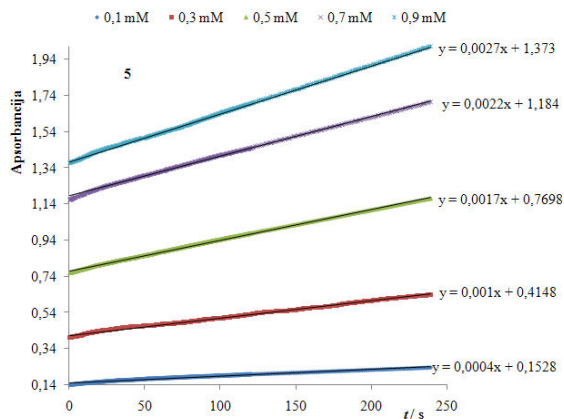
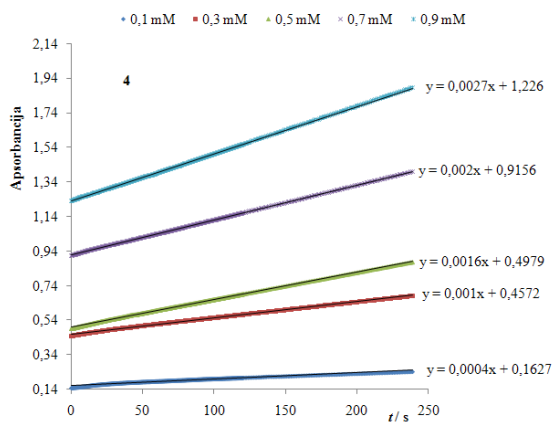
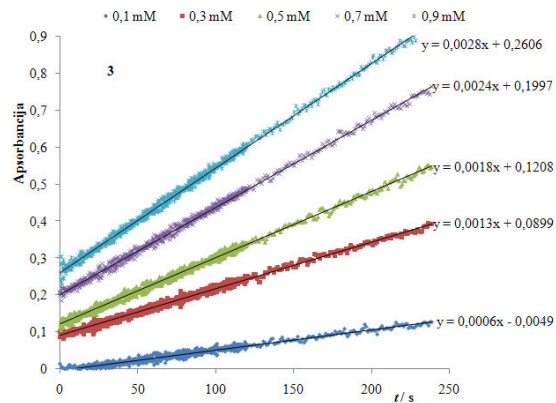
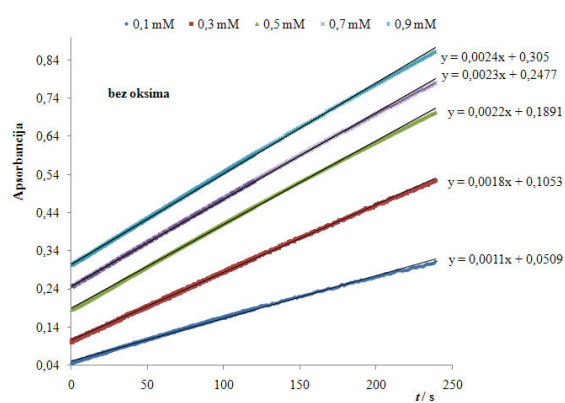
file: ...ktop\NMR spektri\baumann_rox\2\fid expt: <jmod>
 transmitter freq.: 75.475295 MHz
 time domain size: 65536 points
 width: 17985.61 Hz = 238.2980 ppm = 0.274439 Hz/pt
 number of scans: 490

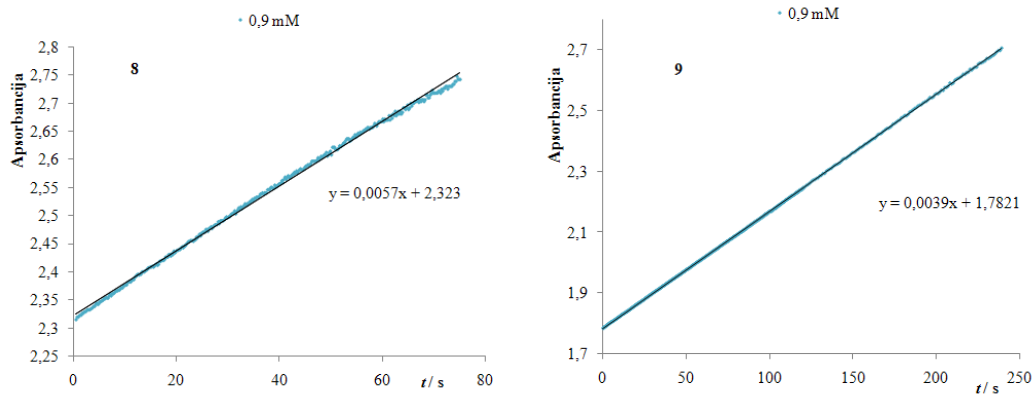
freq. of 0 ppm: 75.467749 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 1.000 GF: 0.0000
 Hz/cm: 365.529 ppm/cm: 4.84303

Slika D8. ^1H (gore) i ^{13}C (dolje) NMR spektar spoja **9**.

2. KINETIČKA MJERENJA

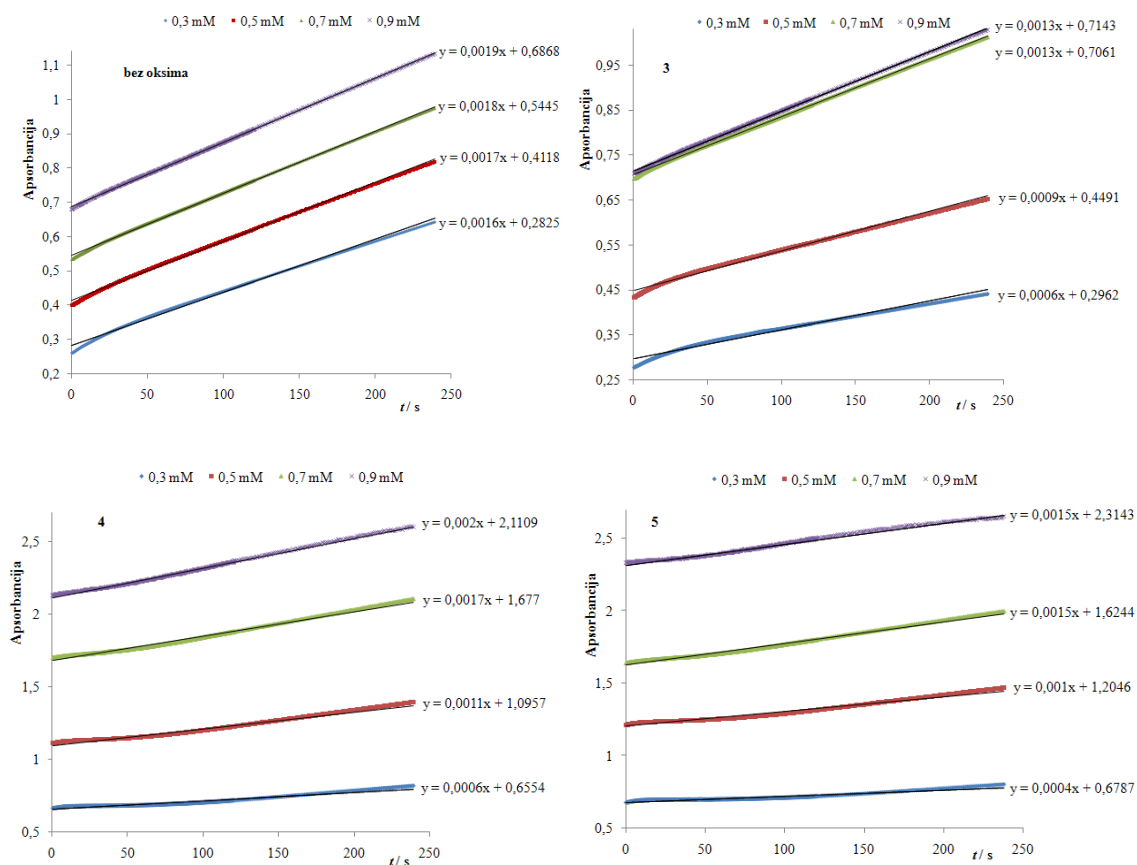
2.1. AKTIVNOST *Hu*BChE

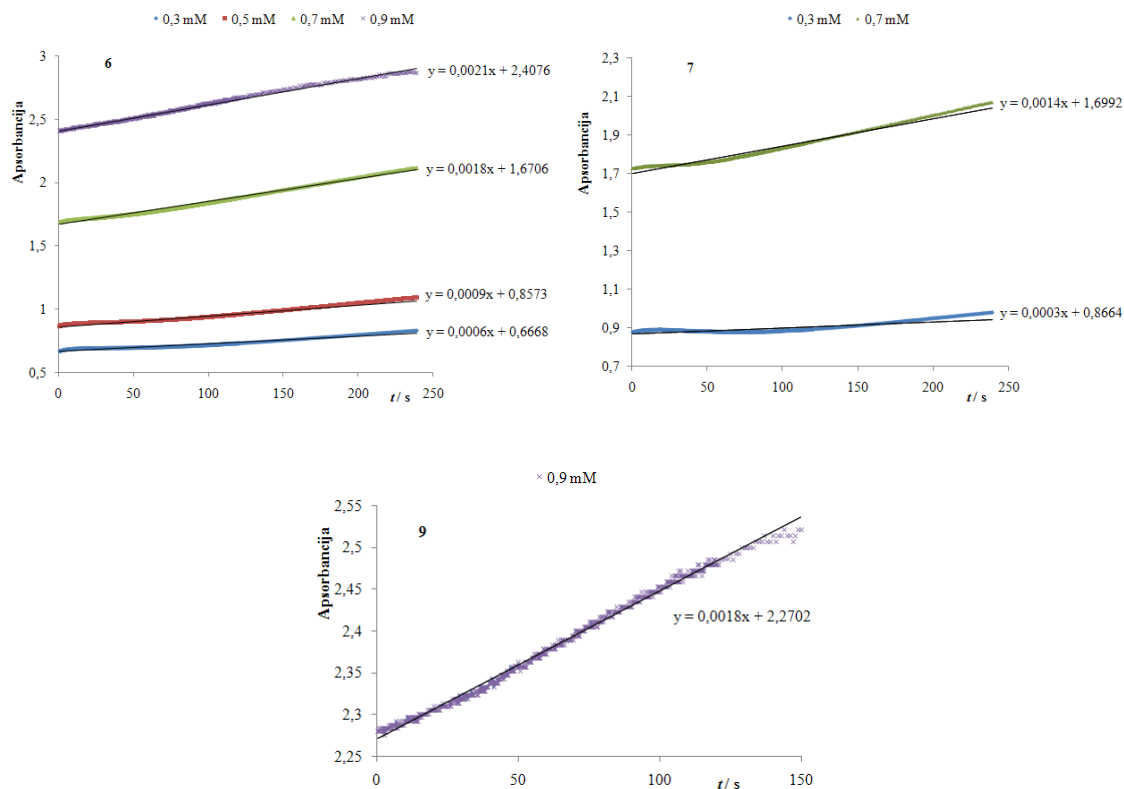




Slika D9. Promjena apsorbancije u vremenu za reakciju kataliziranu BChE iz ljudskog seruma mjerena pri koncentracijama supstrata 0,1-0,9 mmol dm⁻³ bez prisustva oksima i s oksimima 3-9.

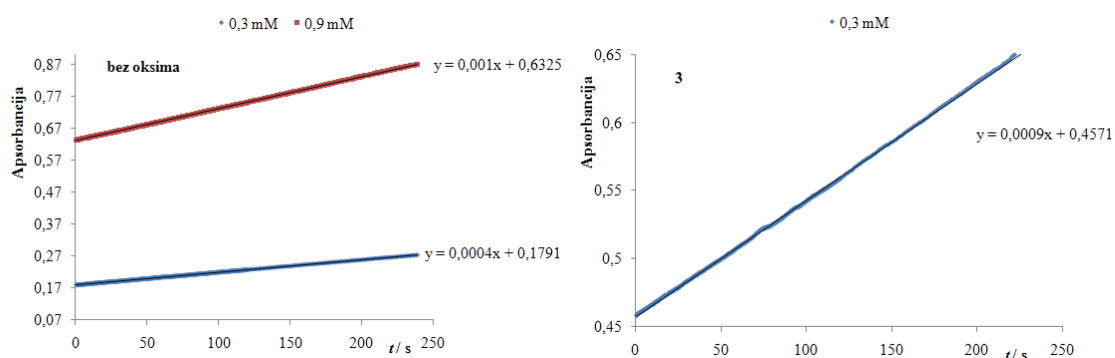
2.2. AKTIVNOST RSBCHE

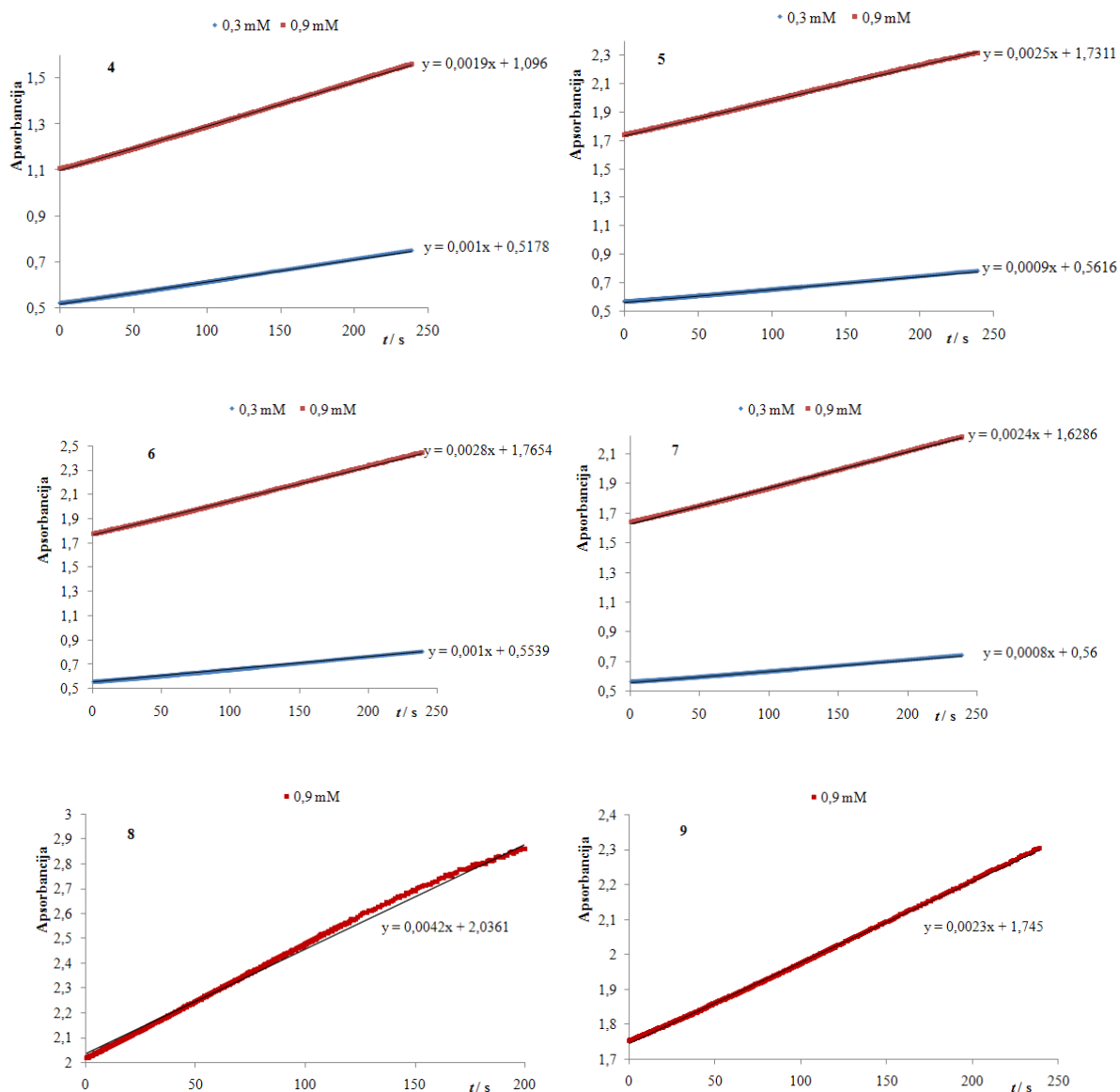




Slika D10. Promjena apsorbancije u vremenu za reakciju kataliziranu BChE iz seruma kunića mjerena pri koncentracijama supstrata 0,3-0,9 mmol dm⁻³ bez prisustva oksima i s oksimima 3-7 i 9.

2.3. AKTIVNOST *Eq*BChE





Slika D11. Promjena apsorbancije u vremenu za reakciju kataliziranu liofiliziranom BChE iz seruma konja mjerena pri koncentracijama supstrata 0,3 i 0,9 mmol dm⁻³ bez prisustva oksima i s oksimima 3-9.