

Imidazolijevi i kinuklidinijevi spojevi – mogući antidoti pri otrovanju organofosfornim spojevima

KUI 21/2004
Prispjelo 5. ožujka 2003.
Prihvaćeno 25. kolovoza 2003.

I. Primožič i S. Tomić

Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Strossmayerov trg 14, HR-10 000 Zagreb

Acetilkolinesteraza (acetilkolin-acetilhidrolaza, E.C. 3.1.1.7) enzim je kojeg inhibiraju neki organofosforni spojevi među koje spadaju i oni koji se koriste kao pesticidi te živčani bojni otrovi. Iako su biskvaterni piridinijevi oksimi dobro poznati kao antidoti, univerzalni antidot koji bi bio udovoljavajuće djelotvoran pri otrovanju organofosfornim spojevima još uvijek nije pronađen. U ovom preglednom članku opisane su sinteze i antidotska svojstva dviju klasa spojeva – imidazolijevih i kinuklidinijevih – obje sa mogućim višestrukim učinkom u kolinergičnom sustavu. *N*-alkilimidazolijevi aldoksimski derivati spojevi su koji pokazuju visoki afinitet za katalitičko mjesto enzima. Primarni antidotski učinak imidazolijevih oksima je reaktivacija fosforilirane AChE. Antidotska djelotvornost 3-supstituiranih kinuklidinijevih derivata rezultat je njihove interakcije s AChE, ali i s drugim receptorima u kolinergičnom sustavu (npr. supresija presinaptičke sinteze acetilkolina). Do sada je sintetizirano nekoliko serija biskvaternih imidazolio-piridinijevih, piridinio-kinuklidinijevih te imidazolio-kinuklidinijevih oksima kako bi se istražila svojstva spojeva koji sadrže u svojoj strukturi po dvije aktivne funkcije. Neki su se od tih derivata pokazali dobrim antidotima organofosfornih spojeva. Raspravljena su svojstva pripremljenih spojeva kao reverzibilnih i progresivnih inhibitora acetilkolinesteraze, acilirajućeg agensa kao i njihova sposobnost zaštite enzima od fosforiliranja te mogućnosti reaktiviranja AChE fosforilirane organofosfornim spojevima.

Ključne riječi: *Acetilkolinesteraza, organofosforni inhibitori, imidazolijevi i kinuklidinijevi spojevi, zaštita enzima, reaktivacija oksimima*

Uvod

S obzirom na fiziološku ulogu acetilkolinesteraze (AChE) u živčanom sustavu, ovaj enzim se već više od pola stoljeća sustavno izučava. Brojne biokemijske, fizičko-kemijske i kristalografske studije, a odnedavno sve više i molekularno modeliranje, primijenjuje se da bi se objasnio način funkcioniranja ovog enzima. AChE je ciljani enzim pri otrovanju organofosfornim spojevima među koje spadaju neki insekticidi i živčani bojni otrovi (soman, sarin, tabun i VX). Rješenje problema zaštite i liječenja pri otrovanju organofosfornim spojevima aktualno je i danas budući da još uvijek nije pronađen antidot koji bi bio udovoljavajuće djelotvoran u slučajevima trovanja različitim organofosfornim spojevima. Antidoti koji su našli primjenu i u humanoj terapiji kvaterni su derivati piridin-2-, odnosno piridin-4-aldoksima.¹

Ovaj rad predstavlja revijalni prikaz dosadašnjih saznanja o AChE, mehanizmima inhibicije organofosfornim spojevima te zaštite i reaktivacije antidotima. Bit će prikazani primjeri iz literature te istraživanja imidazolijevih i kinuklidinijevih antidota pripremljenih u Zavodu za organsku kemiju PMF-a, na kojemu postoji dugogodišnja tradicija bavljenja ovom tematikom.²

Acetilkolinesteraza

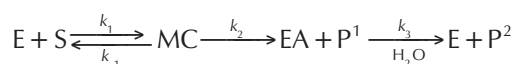
Acetilkolinesteraza (acetilkolin-acetilhidrolaza, AChE, EC 3.1.1.7) ubraja se u skupinu esteraza, podskupinu hidrolaza i podpodskupinu hidrolaza karboksilnih kiselina. Njezina fiziološka funkcija je hidroliza kemijskog transmitera acetilkolina (ACh) tijekom prijenosa živčanih impulsa. AChE spada u najučinkovitije enzime iz porodice serinskih hidrolaza – brzina hidrolize ACh bliska je onima difuzijski kontroliranih reakcija.³ Enzim AChE vezan je na membranu preko kolagenske zavojnice i postoji u obliku monomera, dimera i tetramera.⁴ Brojne biokemijske⁴ i kristalografske⁵ studije omogućile su detaljan uvid u karakteristike enzima na molekularnoj razini i pomogle razumijevanju načina na koji dolazi do inhibicije. Također su dobiveni podaci o načinu na koji ovaj enzim katalizira hidrolizu svojih supstrata.

Prva riješena trodimenzionalna struktura AChE⁶ (*Torpedo californica*) otkrila je da se katalitička trijada sastoji od sljedećih aminokiselina: Ser200, His440 i Glu327. Katalitička trijada nalazi se na dnu ždrijela dubokog oko 20 Å. Oko pukotine nalazi se 14 aromatskih aminokiselina, za koje se pretpostavlja da olakšavaju difuziju supstrata do aktivnog mjesta. U samom aktivnom mjestu još su tri područja takve konfiguracije da omogućavaju brojne interakcije enzima sa

supstratom: vezno kolinsko mjesto, acilni džep i oksianionska šupljina.⁴

AChE je alosterički enzim. Postojanje alosteričke strane enzima dokazano je kinetičkim istraživanjima.⁴ Na alosteričku stranu vežu se određeni supstrati, reverzibilni inhibitori i organofosorni spojevi.⁷ Ligand, kada je vezan na periferno mjesto AChE, može sprječavati ulaz supstrata u ždrijelo steričkim, a kationski ligand i elektrostatskim smetnjama. Također može izazvati i promjenu konformacije aktivnog mjesta.⁴ AChE se alosteričkim mehanizmom inhibira i samim supstratom ACh. Kada se ACh nalazi u velikoj koncentraciji, veže se na periferno mjesto i mijenja konformaciju aktivnog mjesta onemogućavajući vezanje u aktivni centar i hidrolizu.⁴

Katalitički koraci u hidrolizi ACh uključuju: stvaranje Michaelisovog kompleksa (MC), nukleofilni napad enzima (E) na supstrat (S) uz nastanak acetiliranog enzima (EA) te izlazak kolina (P¹). Acetilirani enzim zatim se hidrolizira u octenu kiselinu (P²) i slobodni enzim kako je prikazano na shemi 1.³



Shema 1

Scheme 1

Inhibicija organofosornim spojevima

Pri otrovanju OP spojevima dolazi do inhibicije AChE, pa je stoga poznavanje strukture enzima važno kako pri dizajniranju inhibitora, tako i pri pronalaženju antidota. Neki progresivni inhibitori AChE koji se primjenjuju kao živčani bojni otrovi prikazani su u tablici 1.³

Enzim reagira s progresivnim OP inhibitorima na isti način kao i sa supstratom ACh. U prvom stupnju reakcije dolazi do fosforiliranja enzima, a u drugom do hidrolize i regeneriranja enzima.³ Međutim, brzina hidrolize fosforiliranog enzima puno je sporija (nekoliko minuta, sati, dana ili tjedana) od brzine hidrolize acetiliranog enzima (hidrolizira unutar dijela milisekunde).⁸

Soman, sarin, tabun i VX najpoznatiji su predstavnici živčanih bojnih otrova, tablica 1.⁹ Kod ovih spojeva prije stupnja hidrolize može doći i do dealkilacije fosforiliranog enzima (tzv. starenje enzima).¹⁰ Tako inhibirani enzim puno je teže reaktivirati čak i jačim nukleofilima od vode. Brzina dealkilacije somana (3,3-dimetilbut-2-il-metilfosfonofluoridat) tolika je da je tu reakciju teško pratiti konvencionalnim tehnikama na sobnoj temperaturi i pri pH 7.¹¹ Poluvrijeme brzine "starenja" enzima inhibiranog somanom *in vitro* samo je 6 minuta kod 25 °C,¹² odnosno 2,3 minute kod 37 °C.¹³

Tablica 1 – Strukture nekih živčanih bojnih otrova³

Table 1 – Structures of some nerve warfare agents³

Ime Name	Struktura Structure
Sarin (GB)	
Soman (GD)	
Tabun (GA)	
VX	
DFP	

Mehanizmi djelovanja antidota pri trovanju organofosornim spojevima

AChE može se kako reverzibilnom tako i progresivnom inhibicijom zaštititi od fosforiliranja, a već fosforilirani enzim može se reaktivirati oksimima.¹⁴ Veza između atoma fosfora i enzima cijepa se nukleofilnim napadom oksimske hidroksilne skupine na elektrofilni atom fosfora uz nastanak slobodnog enzima i fosforiliranog oksima, shema 2.

U potrazi za što djelotvornijim oksimskim reaktivatorima istraženi su i brojni derivati mono i biskvaternih piridinijevih aldoksima, a četiri koja su našla primjenu u humanoj terapiji prikazana su u tablici 2.¹⁵

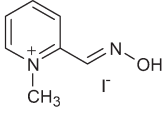
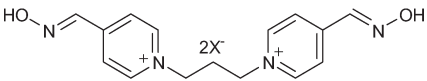
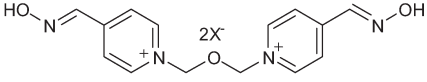
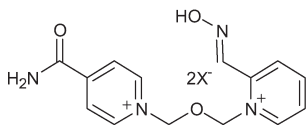
Kolinsko vezno mjesto ostaje slobodno nakon inhibicije organofosornim spojem. Ono može pridonijeti i procesu reaktivacije i zato su kao reaktivatori dizajnirani oksimi koji imaju kvaternu amonijevu skupinu. Antidot se u aktivno mjesto mora smjestiti tako da nukleofilni kisikov atom oksima bude na prikladnoj udaljenosti od atoma fosfora u kompleksu u kojem postoji maksimum interakcija ostatka molekule oksima s enzimom, slika 1.

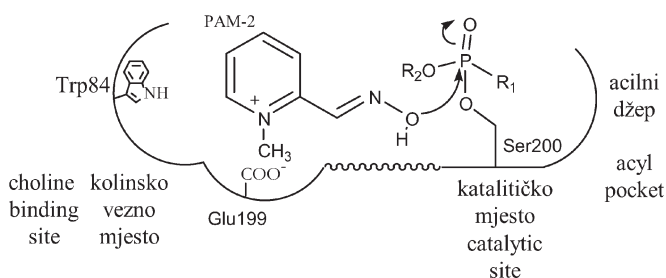


Shema 2

Scheme 2

Tablica 2 – Oksimi koji se primjenjuju kao antidoti u humanoj terapiji pri trovanju organofosornim spojevima¹⁵Table 2 – Oximes which are used as antidotes in human therapy of OP poisoning¹⁵

Oksim Oxime	Struktura Structure	Zaštitno djelovanje Protective potential
PAM-2 (pralidoxime)		zadovoljavajući antidot sarinu i VX, ne reaktivira tabunom i somanom fosforiliranu AChE; effective antidote against sarin poisoning, noneffective against tabun and soman poisoning
TMB-4 Trimedoxime		vrlo dobar antidot tabuna, sarina i VX, kontraindiciran kod trovanja somanom; the most effective antidote against tabun, sarin and VX poisoning, contraindicated in soman poisoning
TOKSOGONIN Toxogonine (obidoxime)		vrlo dobar antidot sarina, VX i raznih pesticida, antidot tabuna, kontraindiciran kod trovanja somanom; the most effective antidote against sarin and VX poisoning, effective against tabun poisoning, contraindicated in soman poisoning
HI-6		izvrstan antidot VX, antidot somanu i sarinu, vrlo slabo djelovanje pri trovanju tabunom excellent antidote against VX poisoning, effective against sarin and soman poisoning, poorly effective against tabun poisoning



Slika 1 – Shematski prikaz orijentacije PAM-2 u aktivnom mjestu fosforilirane AChE

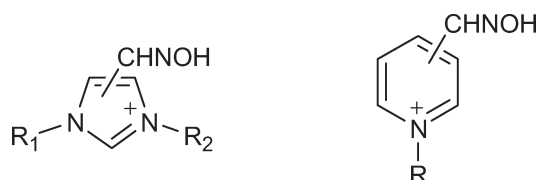
Fig. 1 – Schematic representation of PAM-2 orientation in the active site of phosphorylated AChE

Primjena piridinijevih spojeva PAM-2, TMB-4, toksogonina, HI-6 pri trovanju organofosornim spojevima ograničena je time što niti jedan od njih nije zadovoljavajuće djelotvoran antidot za sva četiri živčana bojna otrova, tablica 2.¹⁵ Primjerice, HI-6 ima visoku moć zaštite i reaktiviranja AChE pri trovanju sarinom i VX, jedini štiti i reaktivira enzim pri trovanju somanom te slabo djeluje pri trovanju tabunom.¹⁵ Međutim, pokusi sa somanom *in vivo* pokazali su da reaktivacija fosforilirane AChE nije jedini mehanizam antidotskog djelovanja oksima.¹⁶ Nađeno je da oksimi u sinapsi hidroliziraju transmitter, inhibiraju otpuštanje transmeta iz presinaptičke stanice u sinapsu, inhibiraju visokoafinitetni kolinski prijenosni sustav (HACHU) te da postoji interakcija s postsinaptičkim i presinaptičkim receptorom.¹⁷ Ova nereaktivatorska djelovanja ukazala su da se dobar terapeutik ne treba tražiti isključivo među reaktivatorima AChE, tj. oksimima.

Derivati imidazola kao antidoti

Istraživanja antidotske djelotvornosti raznih heterocikličkih aromatskih spojeva, ukazala su na imidazolijevu aldoksime

kao moguće antidote, slika 2.^{18,19} Imidazolijevi derivati odabrani su poglavito zbog svoje strukturne sličnosti 1-metilpiridinijevim aldoksimima (slika 2). Osim toga i zbog brojnih sintetskih mogućnosti, lakoće kvaternizacije dušika u prstenu (potrebne Coulombove interakcije s anionskim mjestom AChE) i optimalne kiselosti oksimske hidroksilne skupine (pK_a 8).²⁰ Pretpostavilo se da će delokalizacija naboja između dušikovih atoma, što je karakteristika imidazolijevih sustava, pridonositi boljem vezanju na aktivno mjesto enzima.

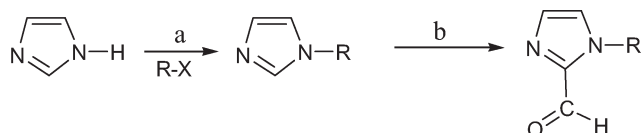


Slika 2 – Opće strukturne formule imidazolijevih i piridinijevih aldoksima

Fig. 2 – General formulae of imidazolium and pyridinium aldoximes

Priprava derivata imidazol-2-aldoksima

Kada odgovarajući *N*-supstituirani imidazol nije komercijalno dostupan, prvi korak u sintezi obilježava alkiliranje dušikovog atoma imidazola. *N*-supstituent na imidazolu može se uvesti reakcijom imidazola s odgovarajućim alkil- ili aril-halogenidom te kalijevim karbonatom kao bazom²¹ ili reakcijom u tekućem amonijaku s elementarnim natrijem, shema 3.²² Tako dobiveni *N*-supstituirani imidazoli mogu se prevesti u 2-karbaldehide reakcijom s *n*-butil-litijem (*n*-BuLi), a zatim, bez izoliranja nestabilnog organolitijevog spoja dodatkom *N,N*-dimetilformamida (DMF)²³ ili reakcijom s formaldehidom nakon koje slijedi oksidacija sa SeO_2 , shema 3.²⁴



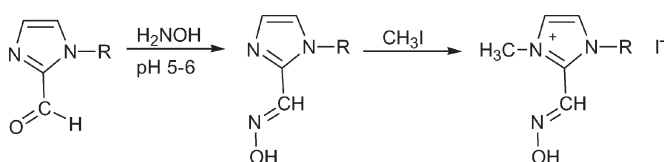
a) $K_2CO_3/CuBr$ ili NH_3/Na ; b) 1. *n*-BuLi, 2. DMF ili 1. HCHO/ Δ , 2. SeO_2

a) $K_2CO_3/CuBr$ or NH_3/Na ; b) 1. *n*-BuLi, 2. DMF or 1. HCHO/ Δ , 2. SeO_2

Shema 3

Scheme 3

Imidazol-2-karbaldehidi lako se prevedu u oksim na uobičajen način reakcijom s hidroksilaminom u etanolu kod pH 5–6, shema 4.²⁵ Standardnim postupkom kvaternizacije tercijarnih amina, reakcijom s metil-jodidom u suhom acetonu, dobivaju se monokvaterni derivati, shema 4.^{18,26,27}



Shema 4

Scheme 4

Simetrični biskvaterni derivati imidazola mogu se prirediti reakcijom *N*-supstituiranih imidazolijevih oksima i odgovarajućih dihalogenalkanskih, dihalogenalkanskih ili dihalogenetarskih^{28,29} lanaca.^{30,31} Biskvaterni imidazolio-piridinijevi derivati priređuju se reakcijom *N*-supstituiranih imidazolijevih oksima i odgovarajućih međuprodukata piridin-aldoksima³² u otopini natrijevog jodida u suhom acetonu.^{26,27,33}

Antidotska aktivnost derivata imidazola

Derivati 1-metilimidazola s hidroksiiminometilnom skupinom na različitim položajima u prstenu istraživani su kao reaktivatori AChE inhibirane diizopropil-fosfonofluoridatom. Samo su se derivati 2-hidroksiiminometilimidazola poka-

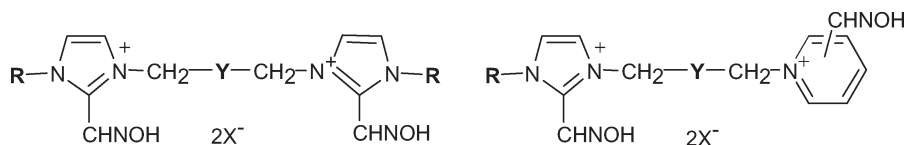
zali aktivni u pokusima *in vitro*. Također, uočeno je da je zamjena 1-metilne skupine 1-arilnom rezultirala boljom reaktivacijskom *in vitro* djelotvornošću pripremljenih spojeva.³⁴

Pripravljene su homologne serije monokvaternih *n*-alkilnih, razgranatih alkilnih, cikličkih, arilnih,²⁰ alkenilnih, alkinilnih i nezasićenih aromatskih¹⁹ alkoksimetil derivata 2-hidroksiiminometil-1-metilimidazolijevih halogenida i određena je njihova mogućnost reaktivacije fosforilirane AChE. Pokazalo se da se uvođenjem razgranatih supstituentata znatno smanjuje reaktivacijska djelotvornost testiranih spojeva *in vitro*.²⁰ Međutim, u pokusima *in vivo* na miševima, upravo su se takvi spojevi pokazali boljim antidotima.^{19,20} Iako su imidazolijevi spojevi dizajnirani da imaju afinitet prema aktivnom mjestu AChE, slaba korelacija između rezultata *in vitro* i *in vivo* ukazala je da mogu antidotski djelovati i drugim mehanizmima osim reaktivacije fosforilirane AChE.^{35,36} Pretpostavljeno je da je prevladavajući mehanizam antidotskog djelovanja upravo reverzibilna, nekovalentna interakcija spoja s katalitičkim mjestom AChE, jer nije primijećena interakcija ovih spojeva s nikotinskim i muskarinskim receptorima.²⁰ Time se štiti enzim od fosforiliranja fizičkim blokiranjem pristupa organofosfatu.

Do danas su pripravljene i ispitane brojne derivati biskvaternih imidazolijevih i imidazolio-piridinijevih aldoksima kojima su heterociklički prstenovi povezani alkanskim, eterkim ili dieterskim lancima, slika 3, te određena njihova antidotska svojstva i interakcija s AChE.^{26,27,33,37–42}

Većina priređenih spojeva pokazali su se jakim inhibitorima AChE. Pokazalo se da tip supstituenta na imidazolijevom prstenu i duljina lanca između prstenova izrazito utječu na inhibitornu moć ovih spojeva.⁴⁰ Općenito, bisimidazolijevi oksimi jači su inhibitori od imidazolio-piridinijevih spojeva. Slab antidotski učinak ovih spojeva pripisan je njihovoj jakoj inhibiciji AChE.

Afinitet imidazolijevih derivata prema AChE pokušalo se iskoristiti da se dizajniraju dobri progresivni inhibitori koji će učinkovito štiti AChE od fosforiliranja. Dobra zaštitna

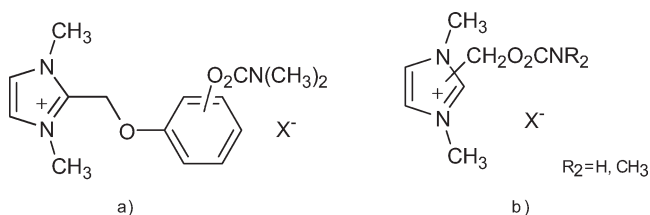


R	Y	Ref.
-CH ₃	-O-	26
-CH ₃ , -CH ₂ C ₆ H ₅ , -C ₆ H ₅ , -C ₆ H ₄ <i>p</i> -OCH ₃	-O-	27
-C ₆ H ₅ <i>p</i> -F	-O-	33
-CH ₃ , -CH ₂ C ₆ H ₅ , -C ₆ H ₅ , -C ₆ H ₄ <i>p</i> -OCH ₃ , -C ₆ H ₅ <i>p</i> -F	-CH=CH-, -(CH ₂) ₂ -	37
-C ₆ H ₅ <i>p</i> -CH ₃	-O-	38
-CH ₃ , -CH ₂ C ₆ H ₅ , -C ₆ H ₅ , -C ₆ H ₅ <i>p</i> -F	-CH ₂ -, -(CH ₂) ₄ -, -O-(CH ₂) ₂ -O-, -O-(CH ₂) ₃ -O-	39, 40

Slika 3 – Pripravljene biskvaterni imidazolijevi te imidazolio-piridinijevi aldoksimi testirani kao antidoti

Fig. 3 – Synthesized bisquaternary imidazolium and imidazolio-pyridinium aldoximes tested as antidotes

svojstva pri otrovanju OP spojevima pokazali su karbamati, jer je hidroliza karbamoilirane AChE u odnosu na jako brzu hidrolizu enzima acetiliranog supstratom te jako sporu reakciju hidrolize AChE fosforilirane živčanim bojnim otrovima umjereno spora reakcija (npr. vrijeme spontane hidrolize ($t_{1/2}$) dimetilkarbamoilirane AChE je oko 1 sat).⁴ Pripravljene imidazolijevi karbamati, prikazani na slici 4 a)⁴³ pokazali su se dobrim karbamoilirajućim agensima, ali i jakim inhibitorima, stoga su neupotrebljivi za terapiju. Međutim, *N,N*-dimetil i *N*-metilkarbamati 1,3-dimetilhidroksimetilimidazola, slika 4 b), analozi *N,N*-dimetilkarbamoilkolina pokazali su puno slabiji afinitet prema enzimu, ali dobra antidotska svojstva u slučaju otrovanja miševa somanom.⁴⁴



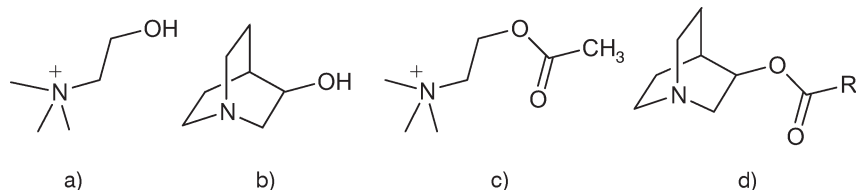
Slika 4 – Imidazolijevi karbamati: a) ref. 43 i b) ref. 44
Fig. 4 – Imidazolium carbamates: a) ref. 43 and b) ref. 44

3-supstituirani derivati kinuklidina kao antidoti

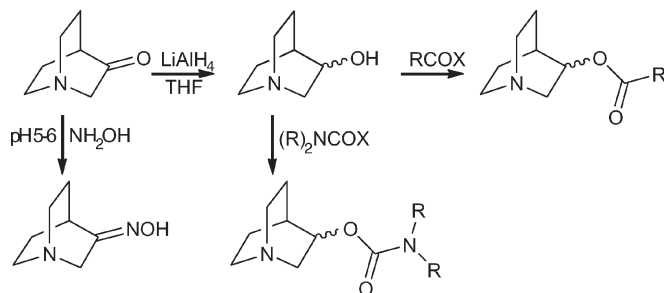
Heterociklički sustav kinuklidina, 1-azabicyklo[2,2,2]oktana, strukturni je dio brojnih prirodnih i sintetskih, fiziološki aktivnih supstancija. Kinuklidin-3-ol i njegovi esteri mogu se promatrati kao biciklički analozi kolina, tj. acetilkolina, pa ne iznenađuje interakcija derivata kinuklidina s raznim receptorima u kolinergičkom sustavu, slika 5.⁴⁵

Priprava derivata 3-supstituiranih kinuklidina

Kinuklidin-3-on komercijalno je dostupna supstanca koja se može prirediti iz etil-izonikotinata u osam sintetskih stupnjeva.^{46,47} Kinuklidin-3-on se lako prevede u oksim ili reducira u kinuklidin-3-ol standardnim sintetskim postupcima, shema 5. U literaturi su opisani načini priprave estera kinuklidin-3-ola s anhidridima kiselina,^{48,49} acil-kloridima,⁵⁰ kiselinom aktiviranom 1,1-karbodiimidazolom⁵¹ te transesterifikacijom s alkoksidom kinuklidin-3-ola.⁵² U tim reakcijama kinuklidin-3-ol istodobno služi i kao baza pa se npr. najbolji prinos pri pripravi *N,N'*-dimetilkarbamata dobiva kada se u reakcijsku smjesu dodaju dva ekvivalenta alkohola koji se tijekom reakcije taloži kao hidroklorid.⁵³

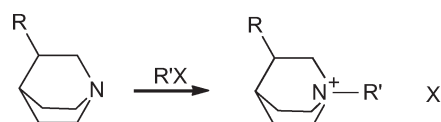


Slika 5 – Strukture a) kolina, b) kinuklidin-3-ola, c) acetilkolina i d) kinuklidin-3-il-acetata
Fig. 5 – Structures of a) choline, b) quinuclidin-3-ol, c) acetylcholine and d) quinuclidin-3-yl acetate



Shema 5
Scheme 5

Iako je bazičnost kinuklidina (pK_a 10,58) približno jednaka bazičnosti alifatskih amina (dietilamin, pK_a 10,77) i *N*-akilpiperidina (*N*-metilpiperidin, pK_a 10,08), kinuklidinski derivati puno brže reagiraju s alkil-halogenidima i lako je prirediti kvaterne, odnosno biskvaterne derivate kinuklidina, shema 6.⁵⁴



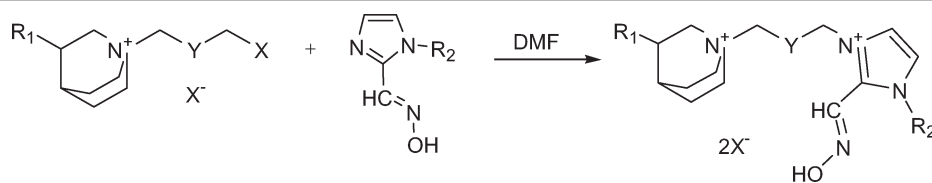
Shema 6
Scheme 6

Međutim, nukleofilnost kinuklidina čini problem kada se žele prirediti kinuklidinijevi međuproducti s odgovarajućim dihalogenoalkanima posebno ako su u pitanju eterski dihalogenidi koji u susjedstvu izlazne skupine imaju kisikov atom.⁵⁵ Zato je potrebno raditi s velikim suviškom dihalogenida i derivat kinuklidina otopiti u što većoj količini otapala te uvoditi u otopinu u što duljem trajanju.⁵⁶

Piridinio-kinuklidinijevi spojevi mogu se prirediti i reakcijom piridinijevih međuproducta³² s odgovarajućim derivatom kinuklidina, a biskvaterni imidazolio-kinuklidinijevi derivati reakcijom odgovarajućeg kinuklidinijevog međuproducta i 1-supstituiranog imidazol-2-aldoksima u suhom DMF, kako je prikazano na shemi 7.⁵⁵ Pokušaji da se prirede međuproducti imidazola rezultirali su redovito nastankom simetričnih biskvaternih derivata imidazola.

Antidotska aktivnost 3-supstituiranih kinuklidina

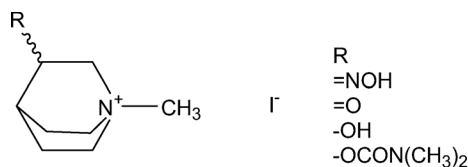
Interakcija s AChE te djelotvornost u zaštiti AChE od inhibicije organofosornim spojevima određena je i za spojeve prikazane na slici 6. Svi testirani spojevi pokazali su se kao reverzibilni inhibitori AChE.^{55,57,58} Za 3-okso i 3-hidroksi derivat pokazano je da osim u katalitičko mjesto dolazi i



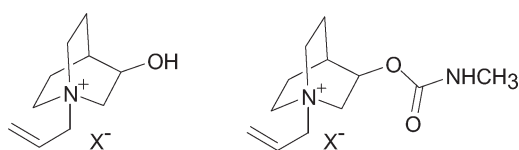
Shema 7

Scheme 7

do vezanja u alosteričko mjesto enzima.^{55,58} *N,N*-dimetilkarbamata kinuklidina, strukture analogne piridostigminu ima 2000 puta slabiju antikolinesteraznu aktivnost.⁵⁸ Razlika u brzini inhibicije mogla bi se objasniti rezonantnom stabilizacijom izlazne skupine koja nastaje karbamoiliranjem enzima piridostigminom. Nadalje, testiran je samo racemat karbamata, a poznato je da samo (*R*)-enantiomer *N*-metilkarbamata kinuklidina progresivno inhibira AChE.⁵⁹ Ispitivanjima *in vivo* pokazalo se da testirani spojevi štite miševе od 2 x LD₅₀ somana, osim 3-hidroksi derivata koji štiti od 1,3 x LD₅₀ somana.^{55,57}

Slika 6 – Kvaterni *N*-metil derivati kinuklidina evaluirani kao antidoti^{55,57,58}Fig. 6 – Quaternary *N*-methyl derivatives of quinuclidine tested as antidotes^{55,57,58}

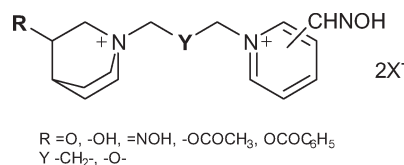
Derivati kinuklidina koji u pokusima *in vitro* inhibiraju sintezu ACh pokazali su dobru zaštitu od otrovanja somanom.⁵⁹ Budući da je mogućnost reaktivacije AChE inhibirane somanom ograničena brzim "starenjem" enzima, a akutna toksičnost somana posljedica prekomjernog nagomilavanja ACh u sinapsi, istražena je zaštitna djelotvornost derivata kinuklidina koji u pokusima *in vitro* inhibiraju sintezu ACh inhibicijom HACHU, slika 7.^{60,61} Nadjelotvornijima su se pokazali 3-hidroksi-*N*-alilni (slika 7) i 3-okso-*N*-metilni (slika 6) kinuklidinijevi derivati.⁶² Nakon jednog sata udjel smrtnosti smanjen je sa 70 % na 30 % odnosno 20 % aplikacijom 1 μmola kg⁻¹ 3-hidroksi, odnosno 3-okso derivata intramuskularno, 30 minuta prije otrovanja somanom (koncentracije koja uzrokuje 80 % smrtnost životinja). Nakon toga je primijenjena terapija atropinom i oksimskim reaktivatorom (PAM-2). Potrebna je opreznost pri tumače-

Slika 7 – Strukture kvaternih 3-hidroksi (jaki inhibitor HACHU) i 3-metilkarbamoiloksi (progresivni inhibitor AChE) *N*-alilnih kinuklidinijevih derivata testiranih kao antidoti u slučaju trovanja somanom^{59,62}Fig. 7 – Structures of quaternary 3-hydroxy (strong inhibitor of HACHU) and 3-carbamoyloxy (progressive inhibitor of AChE) *N*-allyl derivatives of quinuclidine tested as antidotes in soman poisoning^{59,62}

nju mehanizama djelovanja tih spojeva budući da neki testirani spojevi koji također inhibiraju HACHU nisu pokazali zamjetnu zaštitnu djelotvornost.^{60,61}

Karbamoilirani derivat 3-hidroksi-*N*-alil derivata kinuklidina pokazao se kao još bolji antidot pri otrovanju višestrukim LD₅₀ dozama somana.⁵⁹ 3-Metilkarbamoiloksi-*N*-alilkinuklidinijev bromid (slika 7) veže se na AChE karbamoilirajući enzim uz otpuštanje odgovarajućeg alkohola za kojeg se zna da je jaki inhibitor HACHU. Progresivna inhibicija AChE štiti enzim od fosforiliranja, dok otpušteni alkohol, inhibirajući transport kolina, smanjuje nagomilavanje ACh u sinapsi. Očito je da oni spojevi za koje se zna da inhibiraju sintezu ACh čine strukturnu klasu koja može dovesti do razvoja boljeg tretmana u slučaju otrovanja somanom iako se protektivni učinci ovih inhibitora kolinskog prijenosa kroz membranu ne mogu isključivo pripisati upravo djelovanju na HACHU.⁵⁹

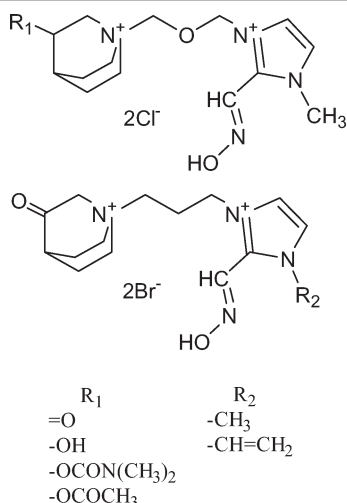
Serija 3-supstituiranih kinuklidinijevih derivata vezanih trimetilenskim, odnosno oksidimetilenskim lancem za piridin-2- tj. piridin-4-aldoksim,^{57,63} dizajnirana je kako bi se dobili spojevi koji osim piridin-2-aldoksimskog dijela (moguća reaktivacija fosforilirane AChE), imaju i 3-supstituiranu kinuklidinsku jezgru koja može osiguravati dodatnu interakciju s receptorima za kolin i acetilkolin na presinaptičkoj i postsinaptičkoj membrani, slika 8.

Slika 8 – Sintetizirani i testirani piridinio-kinuklidinijevi oksimi^{57,63}Fig. 8 – Prepared and tested pyridinio-quinuclidinium oximes^{57,63}

Kao obećavajući antidoti pri otrovanju organofosornim spojevima pokazali su se derivati 3-oksokinuklidina konjugirani s piridin-2- i piridin-4-aldoksimom povezani oksidimetilenskim lancem.^{63,64} Pokazali su izvanredna svojstva u zaštiti i terapiji eksperimentalnih životinja (pokusi na miševima) pri otrovanju somanom (TF 6–7,3).⁶³

Konjugati imidazola i kinuklidina

Da bi se utvrdilo mogu li se u jednoj molekuli dobiti pozitivni učinci i kinuklidinijevih i imidazolijevih derivata, pripravljeni su biskvaterni nesimetrični derivati prikazani na slici 9. Za konformacijsku analizu i određivanje nekih strukturnih parametara sintetiziranih spojeva primijenjeni

Slika 9 – Sintetizirani i testirani imidazolio-kinuklidinijevi derivati^{55–58}Fig. 9 – Prepared and tested imidazolio-quinuclidinium derivatives^{55–58}

su kvantno-kemijski molekularno-orbitalni proračuni *ab initio*.^{56,65}

Antidotska svojstva konjugata imidazola i kinuklidina

Konjugati imidazola i kinuklidina pokazali su se jačim reverzibilnim inhibitorima AChE od kinuklidinijevih derivata, ali slabijim od odgovarajućeg kvaternog derivata imidazola.⁵⁵ Progresivna inhibicija AChE određena je za biskvaterni dimetilkarbammat.⁵⁸ U odnosu na monokvaterni *N*-metilni derivat kinuklidin-3-il-karbamata, biskvaterni derivat s imidazolom pokazao se 60 puta slabijim progresivnim inhibitorom u pokusima *in vitro*. Ispitivanja *in vivo* pokazala su da svi testirani spojevi štite miševе od otrovanja somanom.^{55–57} Za pripravljeni monokvaterni te biskvaterni derivate 3-oksokinuklidina s 3-metilimidazol-2-aldoksimom određeni su pokusima *in vivo* terapijski faktori (2,25 – 2,83) i terapijske doze (2,0–2,52).⁵⁵ Kada su 3-oksokinuklidinijeva i imidazolijeva jezgra povezane oksidimetilenskim lancem (TD 2,52), a ne trimetilenskim (TD 2,00), terapijsko djelovanje je bolje.⁵⁵ Najbolje terapijsko djelovanje (TD) pokazao je biskvaterni dimetilkarbammat, koji je osigurao preživljavanje svih testiranih životinja od 4 LD₅₀ somana.⁵⁷ Nadalje, pokazalo se da povećanjem terapijske doze rezultira i zamjena 1-metilne skupine na imidazolu (TD 2,00) 1-vinilnom skupinom (TD 2,50).⁵⁶ Pokusi *in vitro* pokazali su da spojevi koji imaju 3-okso i 3-*N,N*-dimetikarbamoiloksikinuklidinijevu jezgru imaju bolja biokemijska svojstva od 3-hidroksikinuklidinijevih derivata.⁵⁸

Zaključak

Široka primjena organofosornih spojeva kao, na primjer, učinkovitih dezinficijensa, insekticida te kao živčanih bojnih otrova uvjetuje da se sintezom antidota bavimo sustavno i danas. Poznavanje mehanizama inhibicije, strukture enzima i drugih receptora u kolinergičkom sustavu olakšava razumijevanje procesa koji se događaju i dizajn

potencijalnih antidota. Imidazolijevi i kinuklidinijevi spojevi pokazali su raznovrsne interakcije s kolinergičkim receptorima te čine strukturne klase spojeva koje bi mogle osigurati bolju terapiju u slučajevima otrovanja organofosornim spojevima.

Popis simbola List of Symbols

ACh	– acetilkolin – acetylcholine
AChE	– acetilkolinesteraza (EC 3.1.1.7) – acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7)
HACHU	– visokoafinitetni kolinski prijenosni sustav – high affinity choline uptake
HI-6	– {4-karbamoil-1-[3-(2-hidroksiiminometil-1-piridinio)-2-oksapropil] piridinijev diklorid} – {4-carbamoyl-1-[3-(2-hydroxyiminomethyl-1-pyridinio)-2-oxapropyl] pyridinium dichloride}
LD ₅₀	– akutna toksičnost – acute toxicity
OP	– organofosorni – organophosphorus
PAM-2	– 2-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijev jodid – 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium iodide
Sarin	– fluorid <i>O</i> -izopropilmetilfosfonske kiseline – isopropyl methylphosphonofluoridat
Soman	– fluorid <i>O</i> -pinakoilmetilfosfonske kiseline – pynacolyl methylphosphonofluoridat
Tabun	– amid <i>O</i> -etil- <i>N,N</i> -dimetilcijanofosfonske kiseline – ethyl <i>N,N</i> -dimethylphosphoramidocyanidate
TD	– terapijska doza: broj LD ₅₀ doza organofosornog spoja koje u prisutnosti antidota prežive sve eksperimentalne životinje – highest multiple LD ₅₀ of OP compound fully counteracted by an antidote (survival of all animals)
TF	– terapijski faktor: LD ₅₀ u prisutnosti antidota/LD ₅₀ bez antidota – LD ₅₀ of poison with antidote/LD ₅₀ of poison without antidote
TMB-4	– {4-hidroksiiminometil-1-[3-(4-hidroksiiminometil-1-piridinio)propil] piridinijev dibromid} – {4-hydroxyiminomethyl-1-[3-(4-hydroxyiminomethyl-1-pyridinio)propyl]pyridinium dibromide}
VX	– <i>O</i> -etil- <i>S</i> -(diizopropilaminoetil)metilfosfonotioat – <i>O</i> -ethyl- <i>S</i> -(diisopropylaminoethyl)methylphosphonothioate

Literatura References

1. R. M. Dawson, *J. Appl. Toxicol.* **14** (1994) 317.
2. V. Simeon Rudolf, E. Reiner, Proceedings of the First World Congress on Chemical and Biological Terrorism, Dubrovnik, Hrvatska 2002, str. 124–128.
3. D. M. Quinn, *Chem. Rev.* **87** (1987) 955.
4. P. Taylor, Z. Radić, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34** (1994) 281.
5. Trenutno je u Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) pohranjeno 45 kristalnih struktura AChE iz više organizama kristaliziranih s različitim inhibitorima.

6. J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science*, **253** (1991) 872.
7. Z. Radić, E. Reiner, P. Taylor, *Mol. Pharmacol.* **39** (1991) 98.
8. W. N. Aldridge, A. N. Davison, *Biochem. J.* **55** (1953) 763.
9. P. Taylor, Anticholinesterase agents u A. G. Gilman, L. S. Gudman, T. W. Rall, F. Murad (ur.), *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, Macmillan Publishing Co. New York, 1988, str. 131–149.
10. O. L. Wolthuis, P. M. H. van Helden, B. P. C. Melchers, R. W. Busker, D. M. G. de Groot, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **18** (1994) 469.
11. C. Viragh, R. Akhmetshin, I. M. Kovach, C. Broomfield, *Biochemistry* **36** (1997) 8243.
12. D. B. Coult, D. J. Marsh, G. Read, *Biochem. J.* **98** (1966) 869.
13. J. H. Fleisher, L. W. Haris, *Biochem. Pharmacol.* **14** (1965) 641.
14. B. Wilson, *J. Biol. Chem.* **190** (1951) 111.
15. M. Maksimović, B. Bošković, B. Radović, Lj. Tadić, V. Deljac, Z. Binenfeld, *Acta Pharm. Jugosl.* **30** (1980) 151.
16. R. W. Busker, J. J. Zijlstra, H. J. van der Wiel, B. P. C. Melchers P. M. H. van Helden, *Toxicol.* **69** (1991) 331.
17. P. M. H. van Helden, R. W. Busker, B. P. C. Melchers, P. L. B. Bruijnzeel, *Arch. Toxicol.* **70** (1996) 779.
18. M. Grifantini, S. Martelli, M. L. Stein, *J. Pharm. Sci.* **61** (1972) 631.
19. 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.
20. C. D. Bedford, R. N. Harris, III, R. A. Howd, A. Miller, H. W. Nolen, III, R. A. Kenley, *J. Med. Chem.* **27** (1984) 1431.
21. A. F. Požarski, B. K. Marcoha, A. M. Simonov, *Zh. Obshch. Khim.* **33** (1963) 1005.
22. P. Iversen, H. Lund, *Acta Chem. Scand.* **20** (1966) 2649.
23. U. Gebert, B. Kerekjarto, *Ann. Chem.* (1974) 644.
24. R. G. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **71** (1949) 383.
25. P. Fournari, P. de Cointet, E. Laviron, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **6** (1968) 2438.
26. A. Galoš, V. Deljac, A. Deljac, Z. Binenfeld, M. Maksimović, *Acta Pharm. Jugosl.* **38** (1988) 23.
27. M. Mesić, A. Deljac, V. Deljac, Z. Binenfeld, M. Maksimović, V. Kilibarda, V. Kovačević, *Acta Pharm. Jugosl.* **41** (1991) 203.
28. J. Lichtenberger, L. Martin, *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1947) 468.
29. S. R. Buc, *Org. Synth. Collective Volume 4* (30–39) 101.
30. J. Patočka, J. Bielavsky, F. Ornst, *FEBS Lett.* **10** (1970) 182.
31. V. Deljac, A. Deljac, M. Mesić, V. Kilibarda, M. Maksimović, Z. Binenfeld, *Acta Pharm.* **42** (1992) 173.
32. I. Hagedorn, I. Stark, K. Schoene, H. Schenkel, *Arzneim-Forsch.* **28** (1978) 2055.
33. M. Mesić, A. Deljac, V. Deljac, Z. Binenfeld, M. Maksimović, V. Kilibarda, *Acta Pharm.* **42** (1992) 169.
34. P. Franchetti, M. Grifantini, S. Martelli, M. L. Stein, *J. Med. Chem.* **17** (1974) 18.
35. 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.
36. 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, III, *J. Med. Chem.* **34** (1991) 1368.
37. V. Deljac, A. Deljac, M. Mesić, V. Kilibarda, M. Maksimović, Z. Binenfeld, *Acta Pharm.* **42** (1992) 173.
38. M. Mesić, R. Rončević, B. Radić, A. Fajdetic, Z. Binenfeld, *Acta Pharm.* **44** (1994) 145.
39. M. Mesić, R. Rončević, B. Radić, A. Fajdetic, Z. Binenfeld, *Acta Pharm.* **44** (1994) 151.
40. B. Radić, R. Rončević, M. Mesić, A. Fajdetic, Z. Binenfeld, *Acta Pharm.* **44** (1994) 251.
41. M. Škrinjaric-Špoljar, L. Francišković, Z. Radić, V. Simeon, E. Reiner, *Acta Pharm.* **42** (1992) 77.
42. L. Francišković, M. Škrinjaric-Špoljar, E. Reiner, *Chem.-Biol. Interactions* **87** (1993) 323.
43. R. J. Sundberg, D. Dalvie, J. Cordero, M. Sabat, H. A. Musallam, *Chem. Res. Toxicol.* **6** (1993) 500.
44. R. J. Sundberg, P. Van Nguyen, *Med. Chem. Res.* **7** (1997) 123.
45. M. D. Mashkovsky, L. N. Yakhontov M. E. Kaminka, E. E. Mikhlina, *Progress in Drug Research* **27** (1983) 9.
46. L. H. Sternbach, S. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* **74** (1952) 2215.
47. I. Primožič, *Diplomski rad* (1994)
48. B. Ringdahl, B. Resul, R. Dahlbom, *Acta Pharm. Suec.* **16** (1979) 281.
49. I. Primožič, T. Hrenar, S. Tomić, Z. Meić, *J. Phys. Org. Chem.* **15** (2002) 608.
50. L. H. Sternbach S. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* **74** (1952) 2219.
51. P. Nanjappan, K. Ramalingam, D. P. Nowotnik, *Tetrahedron: Asymetry* **3** (1992) 1271.
52. D. W. McPherson, C. R. Lambert, K. Jahn, V. Sood, R. C. McRee, B. Zeeberg, R. C. Reba, F. F. Knapp, Jr., *J. Med. Chem.* **38** (1995) 3908.
53. K. B. Shaw, *Can. J. Chem.* **43** (1965) 3264.
54. M. D. Mashkovsky, L. N. Yakhontov, *Progress in Drug Research* **13** (1969) 293.
55. V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, M. Škrinjaric-Špoljar, B. Radić, A. Lucić, I. Primožič, S. Tomić, *Arch. Toxicol.* **72** (1998) 289.
56. I. Primožič, *Magistarski rad*, Sveučilište u Zagrebu (1998)
57. A. Lucić, B. Radić, M. Peraica, M. Mesić, I. Primožič, Z. Binenfeld, *Arch. Toxicol.* **71** (1997) 467.
58. E. Reiner, M. Škrinjaric-Špoljar, S. Dunaj, V. Simeon-Rudolf, I. Primožič, S. Tomić, *Chem. -Biol. Interactions* **119–120** (1999) 173.
59. G. H. Sterling, P. H. Doukas, C. Jackson, R. Caccese, K. J. O'Neill, J. J. O'Neill, *Biochem. Pharmacol.* **45** (1993) 465.
60. B. Ringdahl, R. S. Jope, D. J. Jenden, *Biochem. Pharmacol.* **33** (1984) 2819.
61. G. H. Sterling, P. H. Doukas, J. S. Ricciardi Jr., D. W. Biedrzycka, J. J. O'Neill, *J. Neurochem.* **46** (1986) 1170.
62. G. H. Sterling, P. H. Doukas, R. J. Sheldon, J. J. O'Neill, *Biochem. Pharmacol.* **37** (1988) 379.
63. G. Amitai, D. Balderman, R. Bruckstein-Davidovici, M. Spiegelstein, *Bisquaternary antidotes*, US Patent Appl. 4,675,326 (1987)
64. G. Amitai, I. Rabinovitz, G. Zomber, R. Chen, G. Cohen, R. Adani, L. Raveh, *Proceed. 5th Int. Symposium on Protection Against Chem. and Biol. Warfare Agents*, Stockholm, Sweden, 1995, p. 247.
65. I. Primožič, S. Tomić, *Proceedings of the Sixth International Meeting on Cholinesterases and Related Proteins*, La Jolla, California, SAD, 20.-24. ožujka 1998.

SUMMARY

Imidazolium and Quinuclidinium Compounds – Potential Antidotes in Organophosphorus Poisoning*I. Primožič and S. Tomić*

Organophosphorus (OP) compounds used as pesticides and nerve agents inhibit the enzyme acetylcholinesterase (AChE) essentially irreversibly. Bisquaternary pyridinium oximes are well known antidotes against OP poisoning but no fully satisfactory regimen has been found yet. In this survey, syntheses and antidotal properties of two classes of compounds – imidazolium and quinuclidinium – with possible multiple actions in cholinergic system are discussed. *N*-alkyl imidazolium aldoxime derivatives are compounds with the usually high affinity for the catalytic site of the enzyme. The primary antidotal effect of imidazolium oximes is reactivation of phosphorylated AChE. Antidotal efficacy of 3-substituted quinuclidinium derivatives is the result of their interaction with AChE and/or other receptors in the cholinergic system (e.g. suppression of presynaptic synthesis of acetylcholine). Several bisquaternary imidazolium-pyridinium, quinuclidinium-pyridinium and imidazolium-quinuclidinium oximes have been synthesized in order to investigate the properties of compounds containing both moieties in the same molecule. Some of these derivatives proved to be good antidotes against OP poisoning. Compounds were discussed as reversible inhibitors, acylating agents, protectors against phosphorylation, and reactivators of AChE phosphorylated by some OP compounds.

Division of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Strossmayerov trg 14, HR-10 000 Zagreb, Croatia Received March 5, 2003
Accepted August 25, 2003