

Sinteza i modeliranje novih oksimskih derivata furostilbena kao reaktivatora kolinesteraza

Vukovinski, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:916647>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ana Vukovinski

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ana Vukovinski

Sinteza i modeliranje novih oksimskih derivata furostilbena kao reaktivatora
kolinesteraza

DIPLOMSKI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Irena Škorić

Komentor rada: dr. sc. Danijela Barić, viša znanstvena suradnica, IRB

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Irena Škorić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

dr. sc. Danijela Barić, viša znanstvena suradnica, IRB

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu i na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Grupi za računalne bioznanosti.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na svom uloženom trudu u prenošenju znanja, na ukazanom povjerenju i srdačnosti, pomoći i savjetima prilikom izrade ovog rada i cjelokupnog školovanja na fakultetu.

Zahvaljujem komentorici dr. sc. Danijeli Barić s Instituta Ruđer Bošković na nesebičnoj pomoći, strpljenju, susretljivosti i stručnom vođenju kroz područje računalne kemije.

Također, zahvaljujem i ostalim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju na pristupačnosti, pomoći i ugodnoj atmosferi, a posebno asistentici Mileni.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, sestrama i Karlu na neizmjernoj podršci i motivaciji, kao i ostaloj obitelji i prijateljima. Hvala Vam za svaki dan strpljenja, podrške i pomoći.

Sažetak

Novi oksimski derivati furostilbena **10-14** sintetizirani su u svrhu proučavanja biološke aktivnosti s naglaskom na reaktivaciju acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). Prvi korak sinteze je Wittigova reakcija, čime nastaju *cis*- i *trans*-izomeri furostilbena **1-4**. U drugom koraku furostilbeni su podvrgnuti Vilsmeier-Haackovom formiliranju, u svrhu dobivanja aldehida **5-9**, koji se u trećem stupnju reakcije prevode u oksime **10-14**, koji literaturno nisu poznati. U svakoj provedenoj reakciji sinteze oksima teorijski mogu nastati četiri izomera, s obzirom na konfiguraciju dvostruke veze između dva atoma ugljika (*cis*- i *trans*-) te s obzirom na konfiguraciju dvostruke veze između ugljika i dušika oksimske skupine (*syn*- i *anti*-). Oksim **13** jedini daje sva četiri izomera u dovoljnim količinama za izolaciju, dok sukod spojeva **10**, **11**, **12** i **14** neki izomeri nastali samo u tragovima, dok su drugi prevladavali. Sintetizirani i izolirani novi spojevi okarakterizirani su 1D i 2D NMR tehnikama, . Računalnim modeliranjem istraživana je elektronska struktura dobivenih oksimskih derivata i njihova termodinamička stabilnost, te su računalno ispitivani kao potencijalni reaktivatori inhibirane AChE i BChE.

Ključne riječi: furostilbeni, oksimi, kolinesteraze, reaktivacija AChE i BChE, računalno modeliranje

Summary

Synthesis and modeling of new oxime derivatives of furostilbene as cholinesterase reactivators

New oxime derivatives of furostilbenes **10-14** were synthesized for the purpose of studying biological activity with the emphasis on reactivation of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The first step of the synthesis is the Wittig reaction leading to the *cis*- and *trans*-isomers of furostilbenes **1-4**. In the second step, furostilbenes are subjected to the Wilsmeier-Haack formulation, yielding aldehydes **5-9**, which are in the third reaction phase converted to oximes **10-14**, compounds unknown in the literature. In each oxime synthesis carried out, four isomers can theoretically be formed, given the configuration of the double bond between the two carbon atoms (*cis*- and *trans*-), and the configuration of the double bond between the carbon and nitrogen of the oxime group (*syn*- and *anti*-). Only oxime **13** gives all four isomers, while all isomers of compounds **10**, **11**, **12** and **14** are not obtained in enough quantity for characterization and only some isomers were predominant. The synthesized and isolated new compounds were characterized using 1D and 2D NMR techniques. The electronic structure of the obtained oxime derivatives and their thermodynamic stability were investigated by computer modeling and they were computer tested as potential reactivators of inhibited AChE and BChE.

Key words: furostilbene, oximes, cholinesterases, AChE and BChE reactivation, computer modeling

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Kolinesteraze.....	2
2.1.1. Struktura kolinesteraza.....	2
2.1.2. Hidroliza kolinesterazama.....	4
2.1.3. Ireverzibilni inhibitori kolinesteraza	5
2.1.4. Reaktivatori kolinesteraza.....	7
2.2 Oksimi	10
2.2.1. Sinteza furanskih oksima	10
2.2.2. Reaktivnost furanskih oksima	13
2.2.3. Primjena furanskih i tiofenskih oksima.....	16
2.3. Računalno modeliranje	19
2.3.1. Metoda molekularnog pristajanja (<i>Molecular Docking</i>).....	19
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
3.1. Uvod.....	23
3.2. Wittigova reakcija	25
3.2.1. Sinteza heterostilbena 1-4	26
3.2.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva 1-4	27
3.3. Vilsmeier-Haackovo formiliranje	29
3.3.1. Sinteza aldehida 5-9	29
3.3.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva 5-9	31
3.4. Sinteza novih oksimskih derivata furostilbena	33
3.4.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva 10-14	35
3.5. Računalno istraživanje	39
3.5.1. Istraživanje elektronske strukture novih oksimskih derivata	39
3.5.2. Ispitivanje oksimskih derivata kao potencijalnih reaktivatora AChE i BChE.....	43
4. EKSPERIMENTALNI DIO	52
4.1. Opće napomene.....	52
4.2. Sinteza furostilbena 1-4	53
4.3. Sinteza aldehida 5-9	57
4.4 Sinteza oksima 10-14	61
5. ZAKLJUČAK	65

6. LITERATURA	66
ŽIVOTOPIS	70

1. UVOD

Organosfosforni spojevi, najčešće korišteni kao bojni otrovi, inhibiraju enzime AChE i BChE čime nestaje njihova enzimska aktivnost. Fosforilirane kolinesteraze mogu se reaktivirati, odnosno vratiti katalitičku aktivnost, djelovanjem nukleofila. Pedesetih godina prošlog stoljeća dokazano je da inhibiranu AChE mogu reaktivirati spojevi poput hidrosilamina i nikotinhidrosilaminske kiseline, što je dovelo do pretpostavke da bi i drugi spojevi, koji sadrže ionizacijsku NOH skupinu mogli pokazati učinkovitost u reaktivaciji.

U ovom radu naveden je postupak sinteze oksimskih derivata furostilbena te njihova spektroskopska karakterizacija. Prvi stupanj sinteze proveden je Wittigovom reakcijom u kojoj kao konačni produkti nastaju novi furostilbeni. Drugi stupanj je Vilsmeier-Haackovo formiliranje kojim se furostilbeni prevode u aldehide, koji se potom u zadnjem koraku sinteze prevode u odgovarajuće oksime. Za identifikaciju i određivanje struktura novih derivata nepoznatih u literaturi korištene su jednodimenzionalne ^1H i ^{13}C NMR tehnike, te dvodimenzionalna NMR tehnika koja pokazuje korelaciju H-H jezgara (COSY). Provedeno je i računalno ispitivanje u svrhu određivanja elektronske strukture i termodinamičke stabilnosti sintetiziranih oksimskih derivata. S obzirom na to da je poznato da oksimski derivati ulaze u aktivno mjesto enzima i imaju sposobnost reaktivacije kolinesteraza, sintetizirani oksimi računalno su ispitivani kao potencijalni reaktivatori. Biološka aktivnost dobivenih spojeva bit će ispitana i eksperimentalno.

2. OPĆI DIO

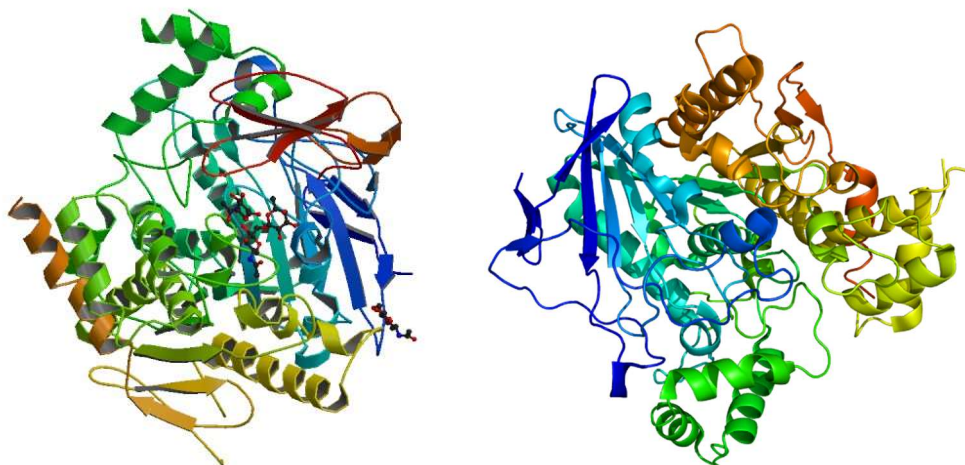
2.1. Kolinesteraze

Početak tridesetih godina prošlog stoljeća primijećeno je smanjenje koncentracije acetilkolina (ACh) u krvi i tkivima.¹ Tada se smatralo da je za to zaslužan enzim koji hidrolizira ACh u krvi kralježnjaka, prema čemu je enzim nazvan kolinesteraza. Kasnijim istraživanjima utvrđeno je da se ne radi samo o jednom enzimu, već da je u eritrocitima prisutna jedna vrsta kolinesteraze, a u serumu druga te svaka pokazuje specifičnost prema određenim supstratima.^{2,3} Prema tome su navedene kolinesteraze nazvane eritrocitna ili prava kolinesteraza i nespecifična ili pseudokolinesteraza, a desetak godina kasnije, 1948. godine, predloženo je da se nazovu aceto- i butiro-kolinesteraza, odnosno acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE) što je zadržano i do danas.^{3,4} Zbog svoje rasprostranjenosti u životinjskom, ali i biljnom svijetu te svoje važne uloge u organizmu, oba se enzima intenzivno istražuju unutar područja biokemije i toksikologije.¹

2.1.1. Struktura kolinesteraza

Kolinesteraze se prema enzimskoj nomenklaturi ubrajaju u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i potpodskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina. Osnovna struktura AChE i BChE čini 12 β -naboranih ploča okruženih s 14- α uzvojnica, što obje kolinesteraze klasificira u skupinu hidrolaza α/β -strukture.¹ Strukture enzima prikazane su na slici 2.1.

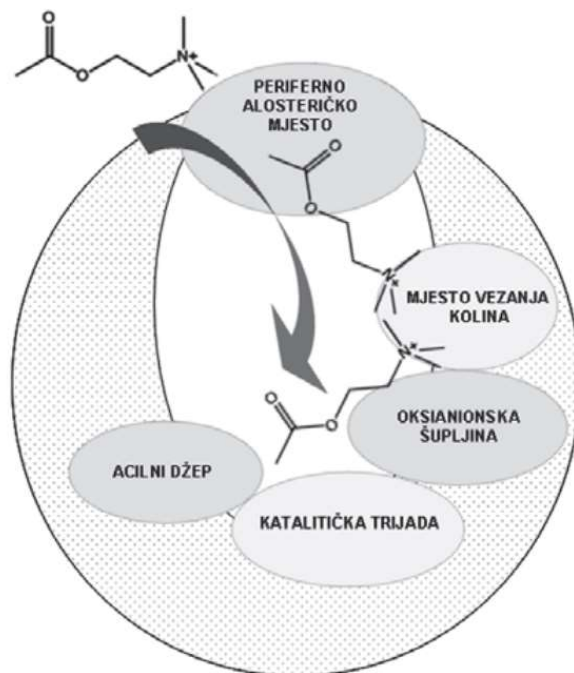
Prostor interakcije sa supstratima i ligandima, aktivno mjesto enzima, kod ljudske AChE precizno je određeno a 14 aromatskih aminokiselina. U svojoj strukturi AChE ima tri *N*-glikozilacijska mjesta Asn-X-Ser/Thr. Kristalna struktura AChE određena je 2000. godine i iako postoji određena varijabilnost različitih specija, aminokiseline koje određuju aktivno mjesto visoko su konzervirane. Kristalna struktura ljudske BChE određena je desetak godina kasnije, zbog velikog broja glikozilacijskih mjesta u strukturi enzima, što je ometalo kristalizaciju. Iako je prilikom određivanja strukture visoki stupanj glikozilacije stvarao probleme, smatra se da on omogućava BChE dugotrajnu stabilnost u plazmi, tj. cirkulaciji krvi, gdje je njezina aktivnost i najizraženija.¹



Slika 2.1. Prikaz struktura enzima acetilkolinesteraze (lijevo) i butirilkolinesteraze (desno).⁵

Iako je BChE strukturno slična AChE, umjesto 14 aromatskih aminokiselina koje se nalaze unutar aktivnog mjesta AChE, kod BChE je njih 6 zamijenjeno alifatskim aminokiselinama. To čini volumen aktivnog mjesta BChE oko 200 Å³ većim u odnosu na aktivno mjesto AChE.^{1,6}

Aktivno mjesto oba enzima je 20 Å dugačko i oko 5 Å široko ždrijelo. Pomoću kristalografije, specifičnog vezanja liganda i ciljane mutagenaze, identificirane su četiri domene koje čine aktivno mjesto oba enzima, prikazane na slici 2.2.

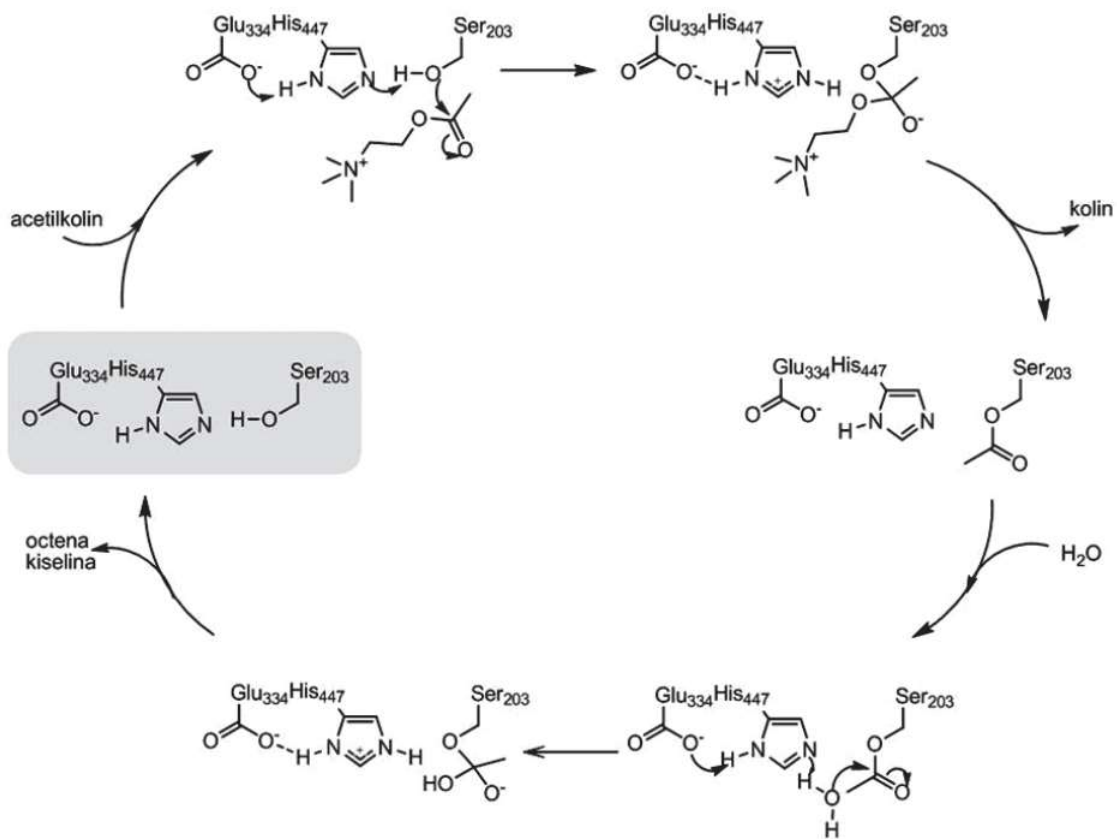


Slika 2.2. Shematski prikaz aktivnog mjesta kolinesteraza. Strelica označava smjer ulaska i pozicioniranja acetilkolina u aktivnom mjestu.¹

Katalitička trijada s oksianionskom šupljinom (katalitičko mjesto) smještena je simetrično na dnu ždrijela, a čine ju aminokiseline Ser203, His447 i Glu334 za AChE te aminokiseline Ser198, His438 i Glu325 za BChE, koje direktno sudjeluju u katalizi. Katalitičko mjesto kolinesteraza sadržava aminokiselinski ogranak glutamata koji je smješten tik do aktivnog serina. Njegova je uloga stabiliziranje prijelaznih stanja tijekom katalize koja se ostvaruje elektrostatskim interakcijama s protoniranim katalitičkim histidinom. Mjesto vezanja kolina (kolinsko mjesto ili kation- π mjesto) važno je za stabilizaciju pozitivno nabijenog kvaternog dijela kolinskih supstrata. Kolinsko mjesto enzima čine aminokiselinski ogranci Trp86, Tyr337 i Tyr338 za AChE te Trp82, Ala328 i Phe325 za BChE. Zbog prisutnosti aromatskih aminokiselina, interakcije između veznog mjesta kolina i liganda jesu kation- π tipa. Triptofan orijentira i omogućava smještanje nabijenog dijela supstrata, omogućavajući time bržu hidrolizu kolinskih supstrata.⁷ Acilni džep odgovoran je za smještanje acilnog dijela supstrata određujući time njegovu orijentaciju prema aktivnom serinu i ostatku enzima. Na rubu ždrijela smješteno je periferno mjesto, koje kod ljudske AChE čine aminokiselinski ogranci tirozina na položajima 72 i 124 te triptofan na položaju 286. Kod ljudske BChE, na odgovarajućim položajima nalaze se alifatske aminokiseline Asn, Gln i Arg pa je stoga otvor u ždrijelo veći.⁸ Zbog te razlike u aminokiselinama BChE ima manji afinitet prema spojevima koji su specifični inhibitori AChE.⁹

2.1.2. Hidroliza kolinesterazama

Iako su aktivna mjesta AChE i BChE različita u sastavu aminokiselina pojedinih domena, mehanizam hidrolize je jednak.¹⁰ Hidroliza kolinesterazama zbiva se u tri koraka, nastajanje Michaelisova kompleksa, aciliranje enzima i njegovo deaciliranje vodom. Aktivni serin i supstrat zajedno stvaraju tetraedarsko prijelazno stanje preko kojeg se odvijaju procesi aciliranja i deaciliranja. Reakcijski stupnjevi u hidrolizi uključuju stvaranje intermedijera u kojemu se acilna skupina supstrata prenosi na serinski ostatak enzima.¹ Na shemi 2.1. prikazan je mehanizam hidrolize acetilkolina kataliziranog kolinesterazama.

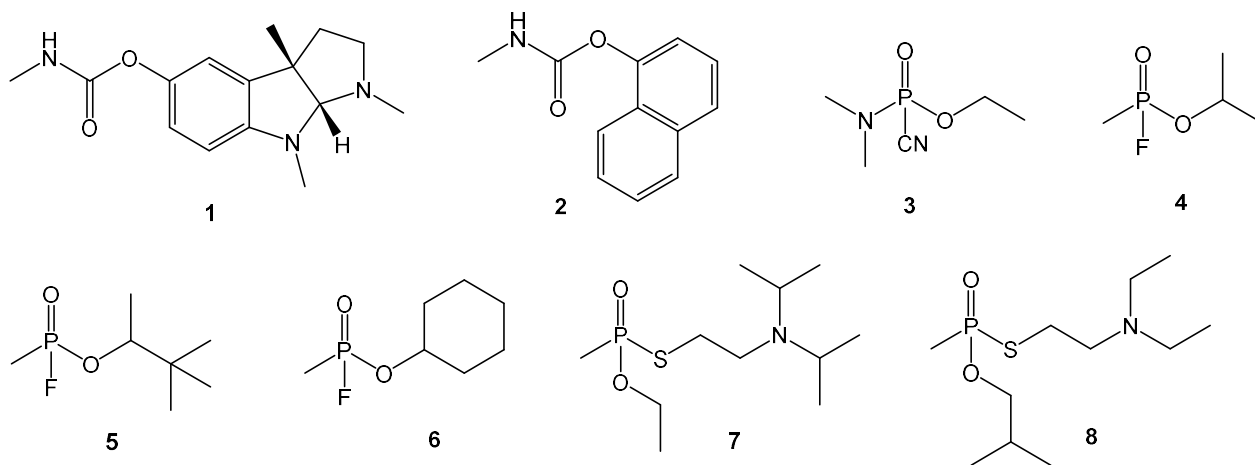


Shema 2.1. Reakcijskih stupnjevi u hidrolizi acetilkolina kataliziranog kolinesterazama.

2.1.3. Ireverzibilni inhibitori kolinesteraza

Irevezibilni inhibitori u aktivnom mjestu enzima formiraju Michaelisov tip kompleksa s katalitičkim serinom, a zatim se inhibitor kovalentno veže s katalitičkim serinom, pri čemu se prijelazno stanje stabilizira interakcijama s aminokiselinama u oksianionskoj šupljini. Prijelazno stanje koje nastaje kod vezanja ireverzibilnih inhibitora analogno je onomu kod hidrolize supstrata.¹¹ Reakcija uklanjanja kovalentno vezanog inhibitora izuzetno je dugotrajna. Strukture nekih od ireverzibilnih inhibitora kolinesteraza prikazane su na slici 2.3. Prvi poznati inhibitor, karbamat fizostigmin **1** (poznat i pod nazivom eserin), izoliran je iz sjemenki biljke *Physostigma venenosum*, a koristi se u terapiji Alzheimerove bolesti. Sintaza ireverzibilnih inhibitora kolinesteraza razvijana je i u svrhu upotrebe ovih spojeva kao pesticida u kontroli nametnika u poljoprivrednoj proizvodnji.¹² Tako je primjerice karbaril **2** jedan od najupotrebljavanijih insekticida, zbog svoje niske toksičnosti. Osim karbamatnih pesticida danas je u upotrebi i oko 80 organofosfornih pesticida kao derivata fosfatne, fosfonske ili fosfinske kiseline. Međutim

ni karbamatni ni organofosfatni pesticidi, iako učinkoviti u djelovanju, ipak ne pokazuju selektivnu inhibiciju AChE između različitih životinjskih vrsta uključujući i čovjeka.¹³ Iz tog su se razloga tridesetih godina prošlog stoljeća počeli koristiti kao kemijsko oružje. Tabun **3** je primjer pesticida kojemu je namijenjena uloga živčanog bojnog otrova. Sintetizirao ga je kemičar Gerhard Schroder 1936. godine u Njemačkoj.¹⁴ Ubrzo zatim, sintetiziran je niz sličnih organofosforinih spojeva (sarin **4**, soman **5**, ciklosarin **6**, VX **7** i VR **8**) kao kemijskih bojnih otrova.¹⁴

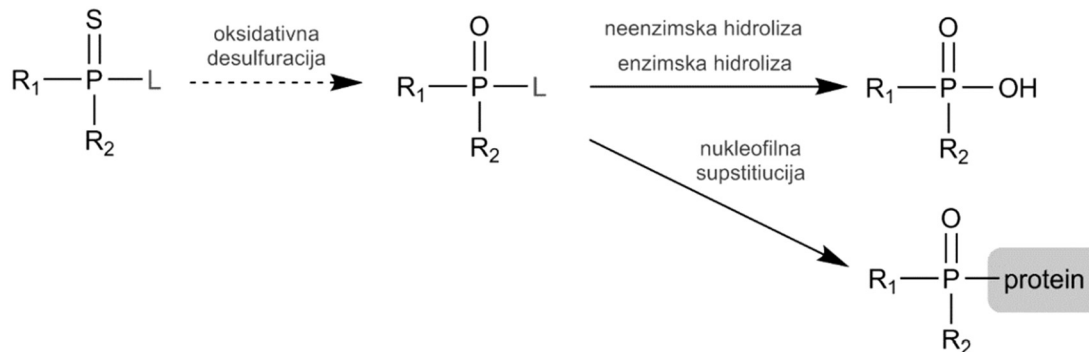


Slika 2.3. Strukture ireverzibilnih inhibitora kolinesteraza (karbamatni (**1**, **2**) i organofosforini spojevi (**3-8**)).¹

Najčešće korišteni bojni otrovi, organofosforini (OP), po kemijskoj strukturi su esteri, anhidridi ili halogenidi dobiveni potpunom supstitucijom fosforne (H_3PO_4), fosfonske (H_3PO_3) i fosfinske kiseline (H_3PO_2). Osnovu OP spoja čini peterovalentni fosfor s kovalentno vezanim kisikom ili sumporom te dva različita supstituenta R_1 i R_2 (alkil-, aril-, alkoksi-, mono- ili dialkil-amino) i izlaznom skupinom L (-F, -CN, -SR₃, -OR₃).¹ Dvije najznačajnije reakcije u koje ulaze OP spojevi koji imaju kisik vezan dvostrukom vezom su hidroliza i nukleofilna supstitucija (shema 2.2.). Hidroliza veze između atoma fosfora i izlazne skupine, čime se gubi toksičan potencijal OP spoja, odvija se neenzimski u vodenom mediju, a ubrzava se pri jako kiselim ili bazičnim pH.^{15,16} Osim spontane neenzimske hidrolize, hidroliza OP spojeva može biti katalizirana enzimima poput hidrolaze fosforinih triestera u koje spadaju paraoksonaze te diizopropil-fluorofosfataze.¹⁷

U organizmu je reakcija hidrolize bitna kao mogući put detoksifikacije te je spoj koji pritom nastaje topljiv u vodi i brže se eliminira iz organizma. Toksičan učinak OP spojeva u organizmu proizlazi iz njihovog elektrofilnog karaktera zbog čega dolazi do nukleofilne supstitucije između OP spoja i određenih bočnih ogranaka aminokiselina pojedinih proteina, enzima ili receptora, što utječe na fiziološko djelovanje tih proteina. Od enzima koje OP spojevi inhibiraju su najbitnije serinske hidrolaze kod kojih dolazi do

nukleofilne supstitucije između OP spoja i serina u aktivnom mjestu enzima. Neke od najvažnijih serinskih hidrolaza su upravo acetilkolinesteraza i butirilkolinesteraza.¹⁸

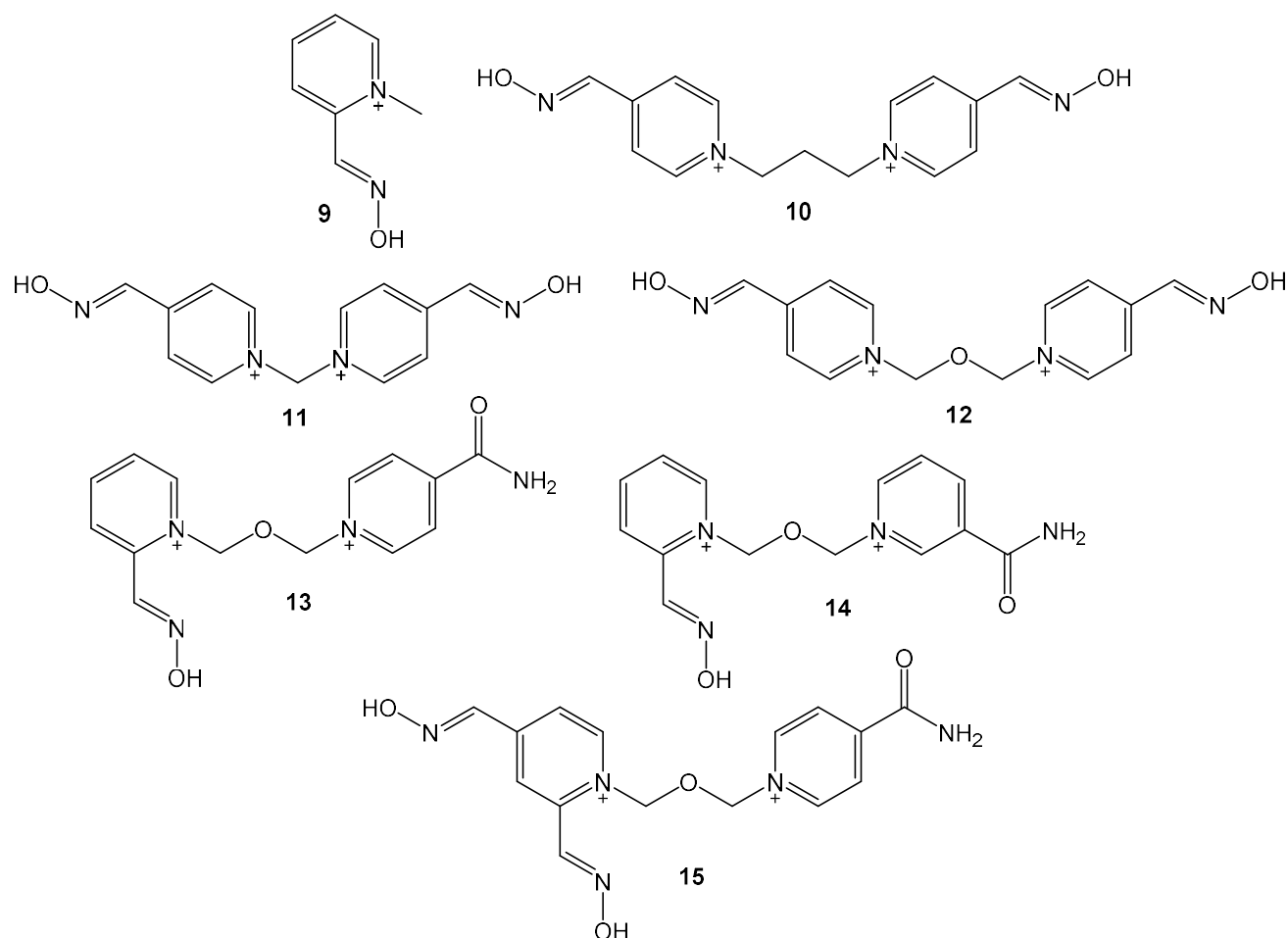


Shema 2.2. Organofosforni spojevi s kovalentno vezanim kisikom imaju toksičan potencijal zbog elektrostatskih svojstava, a gube ga hidrolizom veze između atoma fosfora i izlazne skupine L.¹⁸

2.1.4. Reaktivatori kolinesteraza

Fosforilirane kolinesteraze mogu se reaktivirati, odnosno vratiti katalitičku aktivnost, djelovanjem nukleofila. U slučaju kada je taj nukleofil voda, govorimo o spontanoj reaktivaciji, ali u tom slučaju ona se odvija izuzetno sporo pa je zanemariva. Pedesetih godina prošlog stoljeća dokazano je da inhibiranu AChE mogu reaktivirati spojevi poput hidrosilamina i nikotinhidrosilaminske kiseline, što je dovelo do pretpostavke da bi i drugi spojevi, koji sadrže ionizacijsku NOH skupinu mogli pokazati učinkovitost u reaktivaciji.⁴

Početak razvoja oksimskih reaktivatora nastupio je kada je Jandorf 1951. uočio da hidrosilamin (NH_2OH) u otopini brzo reagira s OP spojevima i ima detoksifikacijski učinak, a Irwin B. Wilson iste je godine dokazao da je povratak aktivnosti enzima inhibiranog tetraetilpirofosfatom (TEPP) u prisutnosti hidrosilamina ubrzan.¹⁹ Davies i Green 1955. godine, istovremeno s Wilsonom i Ginsburgom, sintetiziraju pralidoksim (2-PAM, **9**) koji se i danas koristi u medicinskoj praksi, a koji se ubraja u monopiridinijeve monooksime.²⁰ Trimedoksim (TMB-4, **10**) je prvi sintetizirani bispiridinijev bisoksim s propilenskom poveznicom između prstena, a zatim je sintetiziran i njegov strukturni analog s jednim ugljikom između piridinijevih prstena (MMB-4, **11**).²¹ Osim navedenih oksima, sintetiziranih pedesetih godina prošlog stoljeća, razvijeni su i oksimi LùH-6 (obidoksim; *Toksogonin*, **12**), HI-6 (Asoxime, **13**), HS-6 (**14**) te HLö-7 (**15**).²¹ Strukture navedenih oksima prikazane su na slici 2.4.

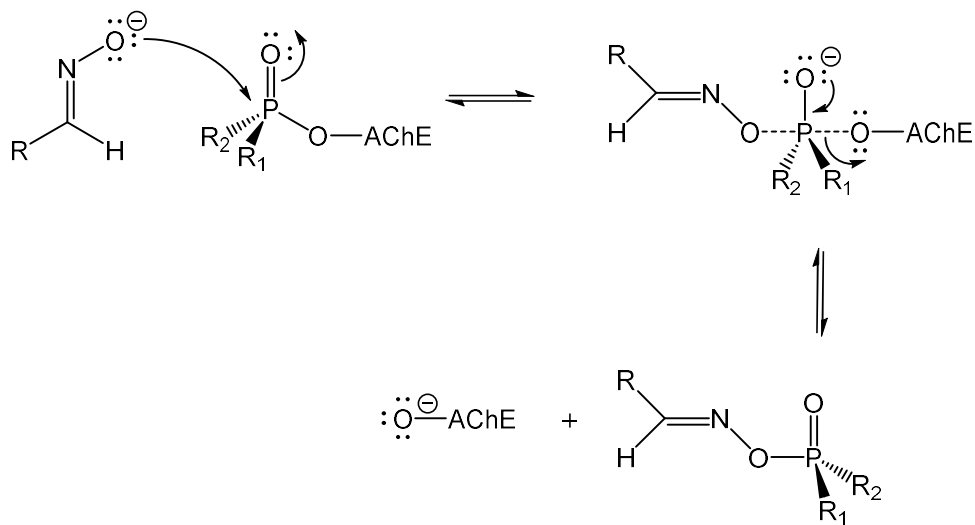


Slika 2.4. Strukture standardnih oksima (**9**, **10**, **12** i **13**) i drugih piridinijevih oksima (**11**, **14** i **15**).¹⁸

Oksim **9** je općenito najmanje učinkovit reaktivator među standardnim oksimima, ali pokazuje učinak u reaktivaciji AChE inhibirane sarinom i VX-om te nešto manje za AChE inhibiranu tabunom i somanom. Oksim **13** učinkovit je reaktivator AChE inhibirane fluorofosfonatima, tj. somanom, sarinom i ciklosarinom.²¹⁻²³ Ukoliko je AChE inhibirana tabunom, oksim **13** u potpunosti je neučinkovit.²⁴ Nedostatak oksima **13** u usporedbi s ostalim oksimima je njegova nestabilnost u vodenim otopinama što otežava njegovu pohranu i dostupnost.²¹ Oksim **12** pokazao se dobrim u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom, sarinom, VX-om te većinom ostalih OP pesticida. Za razliku od oksima **12**, oksim **10** također pokazuje dobru reaktivaciju AChE inhibiranu spomenutim pesticidima, ali nije djelotvoran reaktivator u slučaju inhibicije somanom. Također, oksim **10** najtoksičniji je oksim od navedena četiri standardna oksima.²¹ Osim standardnih oksima, neki od srodnih oksima su pokazali dobru reaktivacijsku učinkovitost iako još nisu odobreni za medicinsku upotrebu. Primjerice, oksim **15** je jedini pokazao reaktivaciju AChE inhibirane tabunom, sarinom, somanom, VX-om i ciklosarinom, a od srodnog oksima **13** je učinkovitiji u reaktivaciji

AChE inhibirane tabunom i VX-om, a oksim **11**, analog oksima **10**, se pokazao učinkovitim reaktivatorom fosfilirane AChE.²⁵

Učinkovitost oksima kao reaktivatora inhibirane AChE usko je povezana sa njihovim strukturnim karakteristikama. Primjerice, bispiridinijski oksimi pokazuju bolju učinkovitost reaktivacije inhibirane AChE, jer enzim pokazuje veći afinitet prema takvoj vrsti oksima, u odnosu na monopiridinijske oksime.²⁶ Osim afiniteta enzima prema oksimima, položaj oksimske skupine ima bitnu ulogu u reaktivaciji. *Orto*- i *para*-položaj oksimske skupine povoljniji je za reaktivaciju od *meta*-položaja zbog ovisnosti pK_a vrijednosti oksimske skupine o njenom položaju na piridinijskom prstenu. Oksimi s oksimskom skupinom u *para*-položaju su učinkovitiji reaktivatori AChE inhibirane tabunom ili OP pesticidima nego oksimi s oksimskom skupinom u *orto*-položaju, dok je u reaktivaciji AChE inhibirane ciklosarinom povoljniji *orto*-položaj oksimske skupine. Ulogu u učinkovitosti reaktivacije inhibiranog enzima ima i duljina poveznice između piridinijskih prstena kod bispiridinijskih oksima.²⁶ Kada je riječ o *n*-metilenskoj poveznici, uočeno je da su u reaktivaciji AChE inhibirane tabunom, sarinom i VX-om, najučinkovitiji reaktivatori s poveznicom od tri ili četiri metilenske skupine, dok je za ciklosarin onaj s jednom metilenskom skupinom u poveznici (oksim **10**). Modifikacije u poveznici, poput uvođenja nezasićenih veza ili heteroatoma, utječu na rigidnost oksima i njegov potencijal za ostvarivanje interakcija s enzimom (npr. zbog prisutnosti slobodnih elektrona).¹⁸



Shema 2.3. Mehanizam reaktivacije fosfilirane AChE oksimom (*R* označava aromatski prsten ili ugljikovodični lanac, dok R_1 i R_2 označavaju supstituente kod OP spoja).

Mehanizam reaktivacije inhibirane AChE oksimom prikazan je na shemi 2.3. Nukleofilnim napadom oksimske hidroksilne skupine na elektrofilni fosforov atom dolazi do kidanja veze između fosforovog atoma i AChE. Pritom nastaje slobodan enzim i fosforilirani oksim. Kvaterni dušik oksima

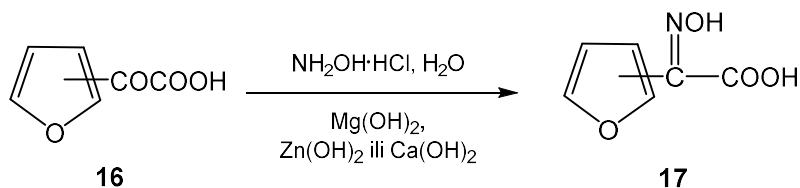
ostvaruje interakcije s aminokiselinskim ostacima mjesta vezanja kolina u ždrijelu aktivnog mjesta AChE te tako sudjeluje u orijentaciji oksima kako bi se oksimska skupina, tj. oksimatni anion našao na što optimalnijoj udaljenosti od fosfiliranog katalitičkog serina (5-6 Å) da bi moglo doći do nukleofilnog napada.⁴

2.2 Oksimi

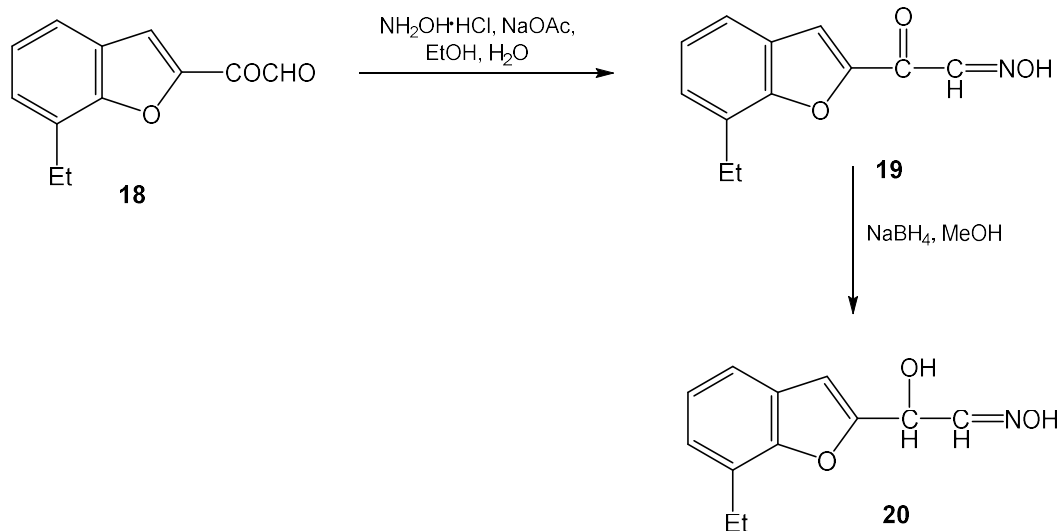
Već spomenuti oksimi, poput oksima **9-15**, koriste se kao reaktivatori inhibirane AChE ili su u završnim fazama razvoja, a struktura im je temeljena na disupstituiranom piridinskom prstenu. U ovom radu naglasak će biti stavljen na oksime s karakterističnim heterostilbenskim skeletom, točnije oksimske derivate furostilbena.

2.2.1. Sinteza furanskih oksima

Klasična metoda sinteze furanskih oksima temeljena je na reakciji aldehida ili ketona s hidroksilaminom, uz prisutnost NaOH/H₂O, KOH/EtOH, K₂CO₃/EtOH ili NaOAc.^{27,28} Kao baze u sintezi oksima najčešće se koriste metalni hidroksidi poput magnezijevog, cinkovog i kalcijevog hidroksida. Primjer sinteze oksima **17** prikazan je na shemi 2.4. Reakcijom furilglioksalne kiseline **16** s NH₂OH·HCl u vodi, uz prisutnost hidroksida, nastaje 2-(2-hidroksiimino)octena kiselina u obliku smjese *syn*- (80-98%) i *anti*-izomera (2-20%). Na shemi 2.5. prikazana je sinteza oksima **19**, iz 2-(7-etilbenzofuril)glioksala **18** i NH₂OH·HCl, uz prisutnost natrij-acetata, NaOAc. Produkt, 7-etilbenzofuran-2-ilglioksal oksim, nastaje samo u obliku *Z*-izomera. Daljnjom redukcijom s NaBH₄ nastaje smjesa *E*- i *Z*-izomera α-hidroksialdoksima **20**, koji su u omjeru *E/Z* = 4/1.

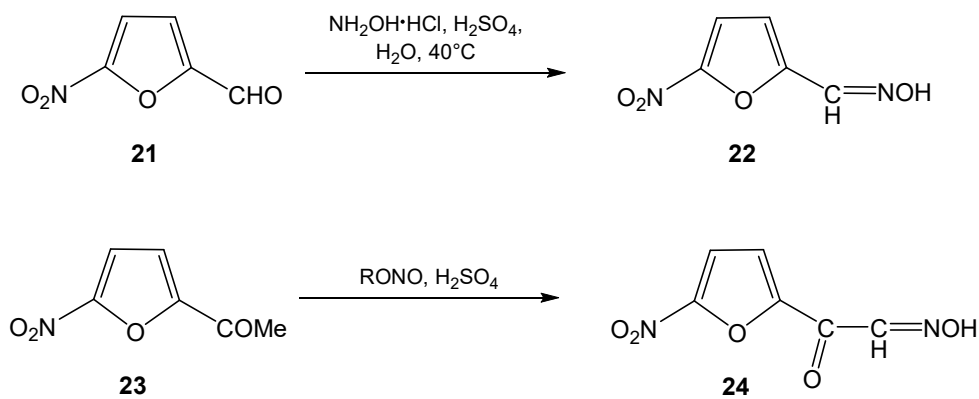


Shema 2.4. Sinteza oksima **17** iz furilglioksalne kiseline **16** i NH₂OH·HCl.



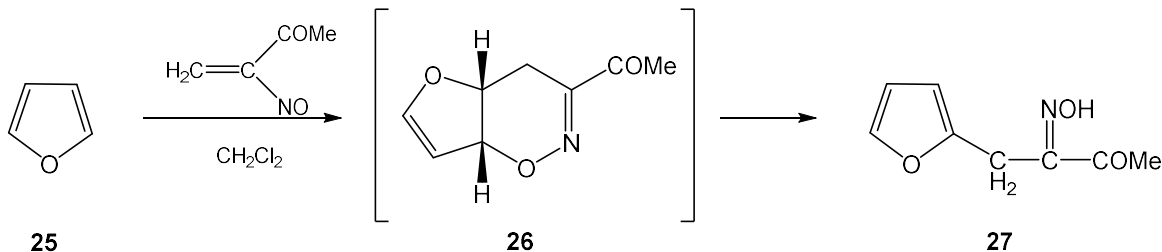
Shema 2.5. Sinteza oksima **19** i daljnja redukcija do α -hidroksialdoksima **20**.

Osim u lužnatim uvjetima, sintezu furanskih oksima u nekim je slučajevima moguće provesti u kiselom mediju. Primjeri takvih reakcija prikazani su na shemi 2.6. E-izomer 5-nitro-2-furankarbaldehida **22** lako se dobiva iz 5-nitro-2-furankarbaldehida **21**, uz prisutnost $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$ u vodi. Uz prisutnost koncentrirane sulfatne kiseline moguće je provesti sintezu 2-(5-nitrofuran)glikosaldehid oksima **24** iz acetil-5-nitrofurana **23** s alkininitrom.



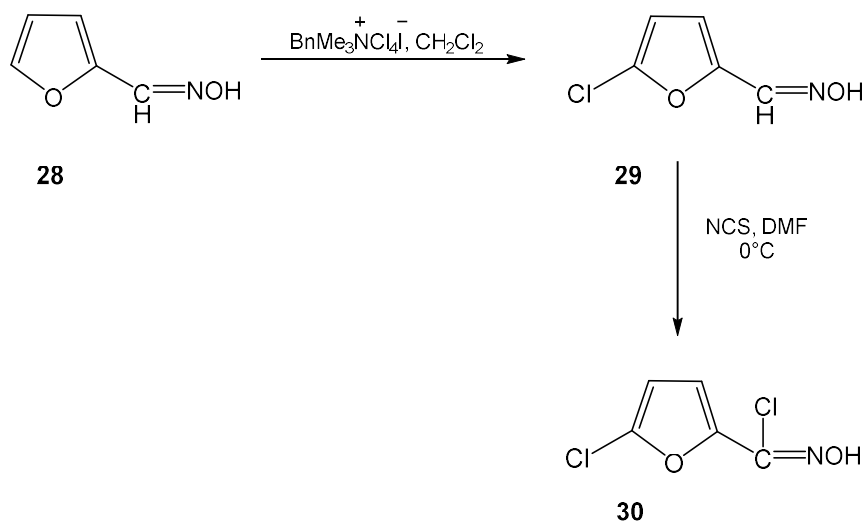
Shema 2.6. Prikaz reakcija sinteze oksima **22** i **24** u kiselim uvjetima.

Furanski oksimi u nekim su istraživanjima nastali neočekivano. Primjer takve reakcije je cikloadicija furana **25** (shema 2.7.) pri čemu kao intermedijer nastaje 1,2-oksazin **26** koji se lako izomerizira u oksim **27** na sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od 2 sata.²⁹



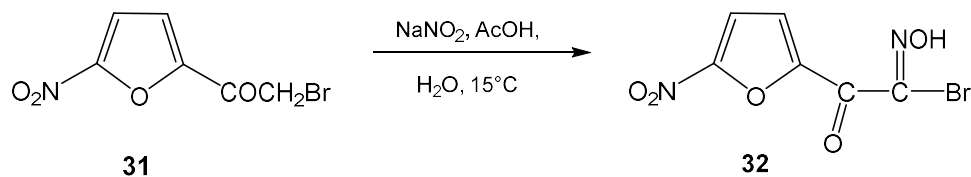
Shema 2.7. Dobivanje oksima **27** kao neočekivanog produkta reakcije cikloadicije furana **25**.

Furanski oksimi često se koriste i kao intermedijeri u reakcijama sinteze hidroksimoil-klorida, sve češće korištenih spojeva u organskoj sintezi. Na shemi 2.8. prikazana je sinteza hidroksimoil-klorida **30**, koji nastaje kloriranjem 2-furankarbaldehid oksima **28** s $\text{BnMe}_3\text{NCl}_4$. Prvi stupanj reakcije u visokom je iskorištenju, s obzirom na to da se furanski prsten lako halogenira. Međuprodukt, 5-klor-2-furankarbaldehid oksim **29** jednostavno se reakcijom prevodi u odgovarajući hidroksimoil-klorid **30** uz pomoć NCS-a u dimetilformamidu (DMF).³⁰



Shema 2.8. Prikaz sinteze hidroksimoil-klorida **30** iz furanskog oksima **28**.

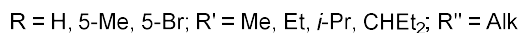
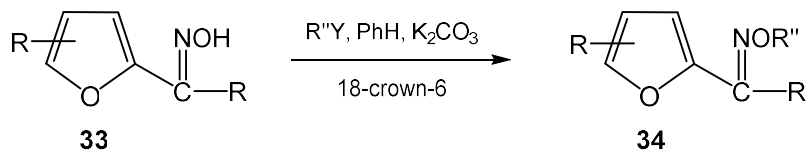
Osim klorida, često se preko furanskih oksima sintetiziraju i bromidi. Na shemi 2.9. prikazana je sinteza 5-nitro-2-furilgliksiloil bromida **32** iz ketona **31**, prevođenjem metilne skupine u oksimsku skupinu.



Shema 2.9. Sinteza 5-nitro-2-furilglioksiloil bromida **32** iz ketona **31**.

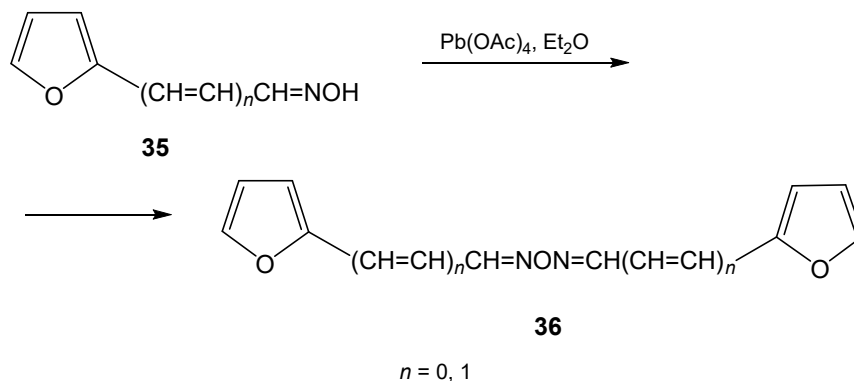
2.2.2. Reaktivnost furanskih oksima

Furanski oksimi često su podvrgnuti raznim kemijskim reakcijama, u svrhu dobivanja novih derivata s izraženom biološkom aktivnošću, primjerice oksimskih etera. Primjer jedne takve reakcije je alkiliranje furanskog oksima **33** s alkilnim halogenidima u dvofaznom sustavu $\text{K}_2\text{CO}_3/18\text{-crown-6}/\text{C}_6\text{H}_6$ pri sobnoj temperaturi (shema 2.10.). Kao produkt reakcije nastaje smjesa *E*- i *Z*-izomera oksimskog etera **34** s iskorištenjem do 74%.³¹



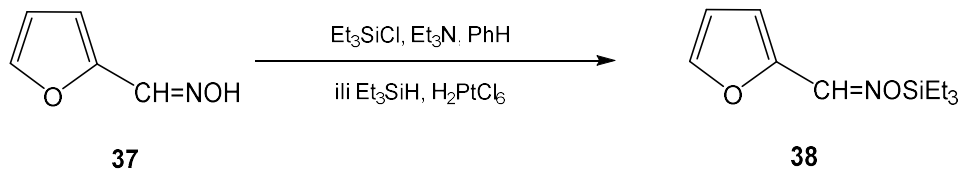
Shema 2.10. Sinteza oksimskog etera **34** iz oksima **33**.

Visoki stupanj iskorištenja reakcija alkiliranja uočeni su samo u slučajevima korištenja alkilbromida ili alkil-jodida kao sredstva za alkiliranje. Osim reakcija alkiliranja, oksimi mogu biti podvrgnuti i reakcijama dimerizacije. Primjer takve reakcije prikazan je na shemi 2.11., u kojoj furan-aldoksim **35** s $\text{Pb}(\text{OAc})_4/\text{Et}_2\text{O}$ daje N-oksid **36** kao glavni produkt, s iskorištenjem reakcije od 16 do 30%.³²



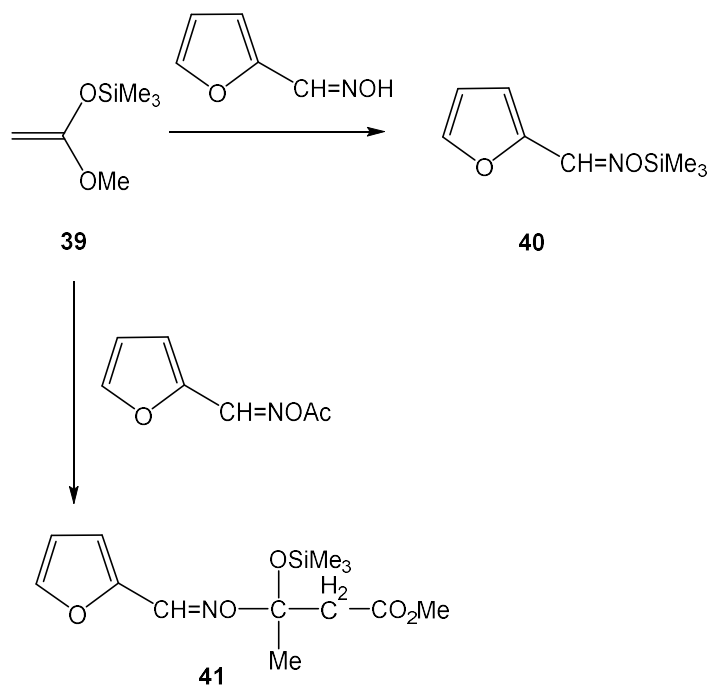
Shema 2.11. Primjer reakcije dimerizacije oksima **35**.

Sililni eter furfural oksima **38** dobiven je reakcijom furfural oksima **37** s trietilchlorosilanom, uz prisutnost trietilamina. Produkt **38** također je moguće dobiti zagrijavanjem oksima **37** s trietilsilanom uz prisutnost H_2PtCl_6 , ali u tom slučaju moguće su pojave neželjenih reakcija, poput redukcije.³³

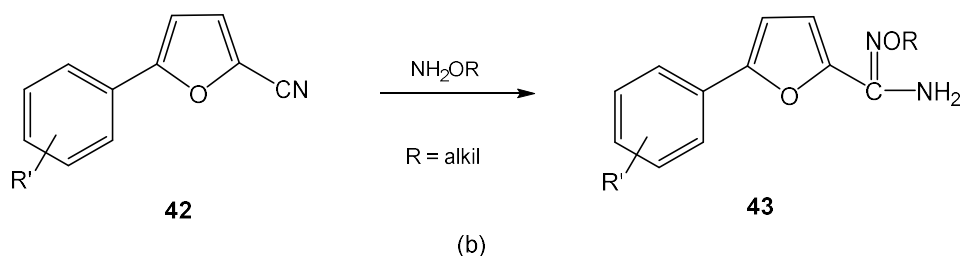


Shema 2.12. Sinteza sililnog etera furfural oksima **38** iz furfural oksima **37**.

Silirani acetali ketena također reagiraju s oksimima ili oksim-acetatima. Primjer takve reakcije prikazan je na shemi 2.13. (a). Reakcija 2-furaldehid oksima s 1-metoksi-1-trimetilsililoksietenom **39** dovodi do siliranog oksima **40**. 2-furankarbaldehid O-acetiloksim i alken **39** daju silirani O-eter oksima **41**.³⁴ O-eteri furan-amidoksima **42** dobiveni su reakcijom odgovarajućih nitrila **43** s O-alkilhidroksilaminom uz prisutnost KOH/EtOH ili NaOMe/MeOH (shema 2.13. (b)). Dobiveni spoj **43** koristi se kao antidepresiv.³⁵

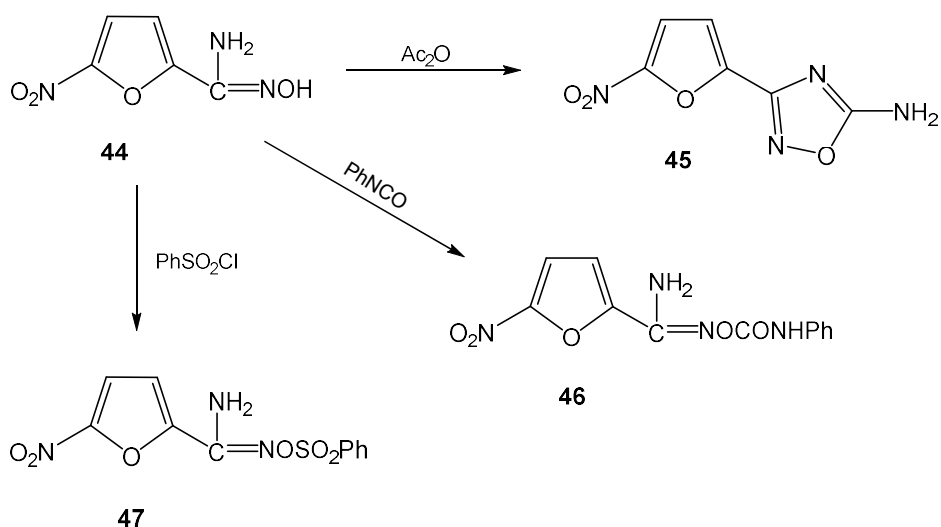


(a)



Shema 2.13. (a) Sinteza siliranog oksima **40** i siliranog O-eter oksima **41** iz alkena **39**; (b) Sinteza antidepressiva **43** iz O-eter furan-amidoksima **42**.

Acilirani furanski amidoksimi dobiveni su reakcijom odgovarajućih amidoksima s kiselinskim kloridima u sustavu K_2CO_3 /aceton ili anhidridom octene kiseline.^{36,37} Međutim, reakcija 5-nitro-2-furankarbamidoksima **44** s anhidridom octene kiseline daje derivat 1,2,4-oksadiazol **45** kao glavni produkt. Produkti aciliranja **46** i **47** dobiveni su reakcijom oksima **44** s fenilizocijanatom, odnosno benzensulfonilkloridom.³⁸

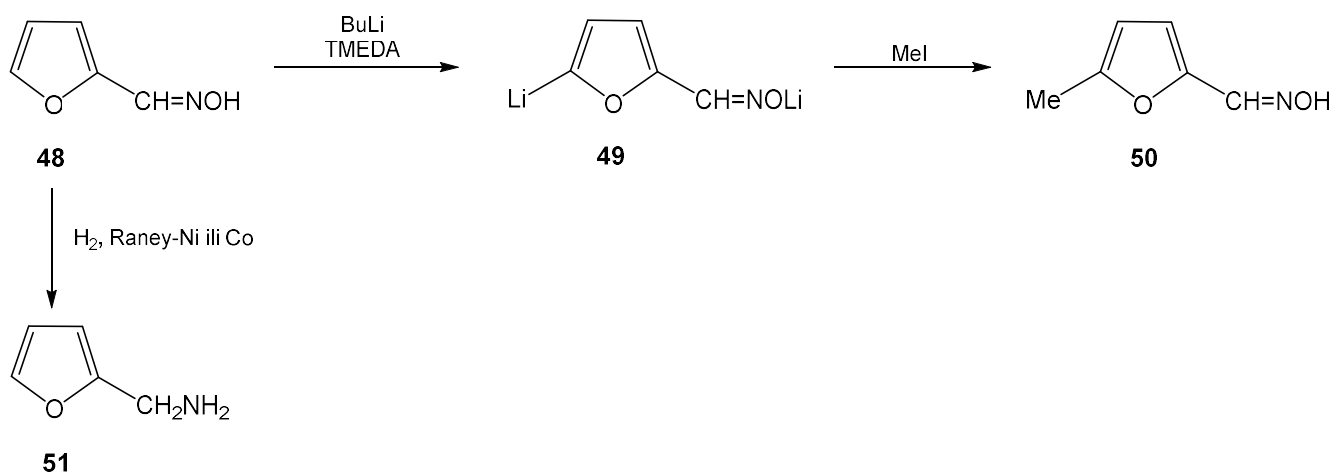


Shema 2.14. Sinteza aciliranih furanskih amidoksima.

Sinteze 2,5-disupstituiranih furanskih prstena s oksimskom skupinom sve su češće i primjenjenije. Uz već spomenute reakcije, na shemi 2.15. prikazana je sinteza 5-metilfurankarbaldhid oksima **50**, koji nastaje u visokom iskorištenju od 95% iz Z-izomera 2-furankarbaldhid oksima **48** i BuLi. Kao međuprodukt nastaje spoj **49**, koji se prevodi u konačan oksim **50** pomoću metil-jodida.³⁹

Furanski oksimi lako se mogu prevesti u odgovarajuće nitrile, uz prisutnost $POCl_3$ /DMF, DBU/MeCN, Ac_2O ili PhNCS, NaOMe/MeOH/DMF ili $CHCl_3$ /KOH (60% aq.)/Oct₄NBr/PhMe.⁴⁰⁻⁴⁵ U

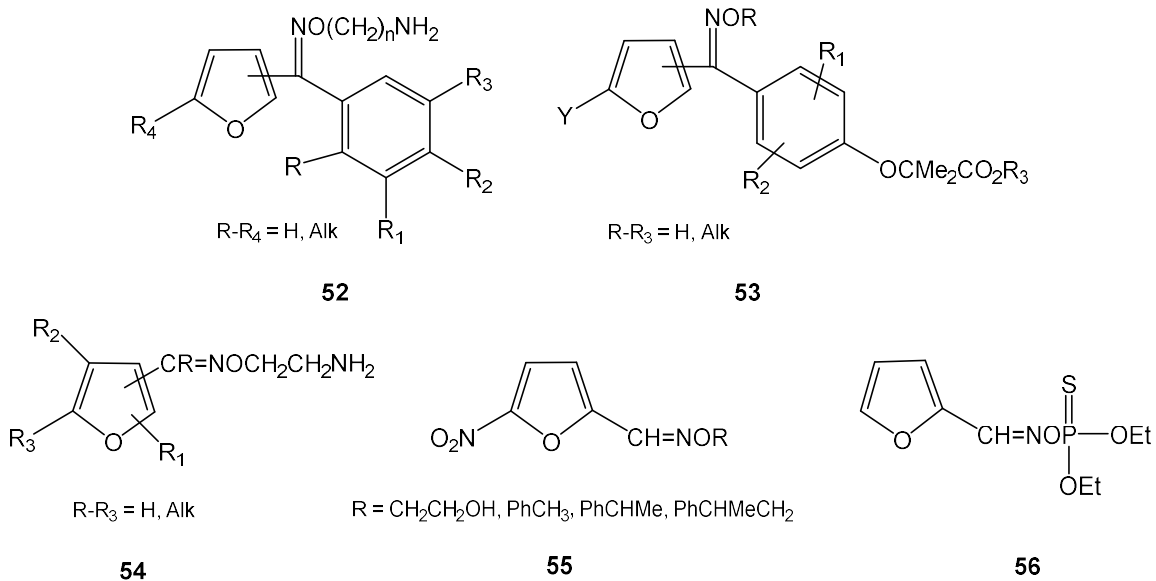
hidrogeniranju 2-furankarbaldehid oksima **48**, uz prisutnost katalizatora Raney-Ni ili Co, nastaje odgovarajući 2-furfurilamin **51**, s prinosom do 51%.^{46,47}



Shema 2.15. Prikaz sinteze 2,5-disupstituiranog furanskog oksima **50** i hidrogeniranje oksima **48**.

2.2.3. Primjena furanskih i tiofenskih oksima

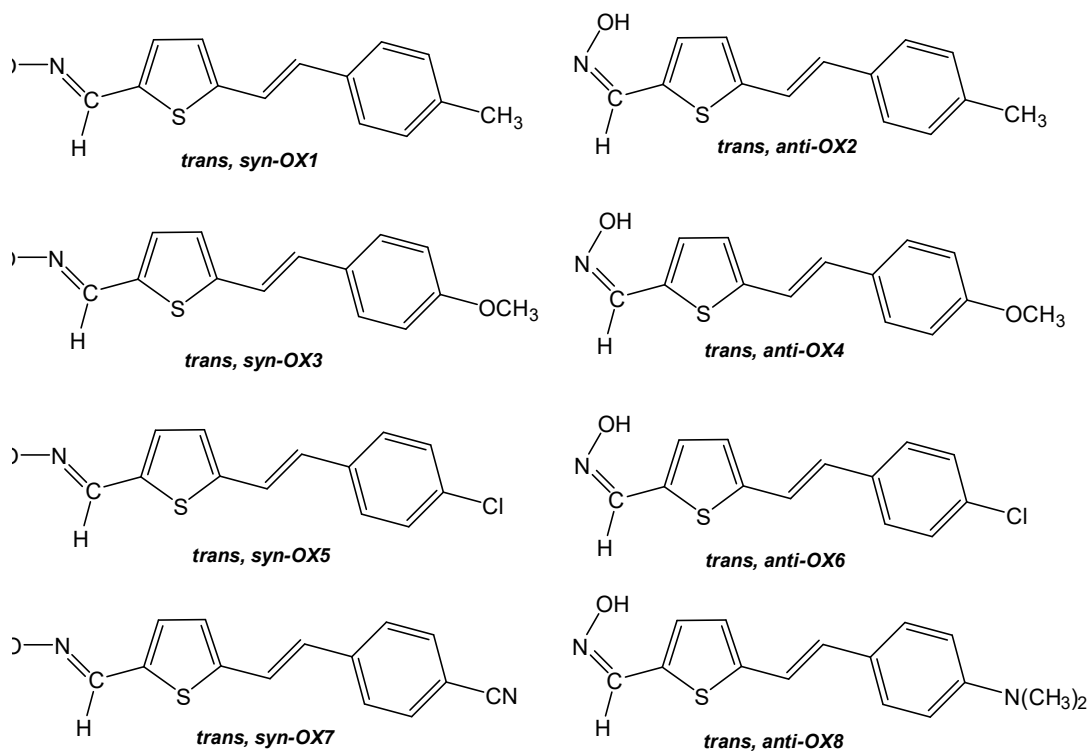
Furanski oksimi i njihovi derivati često su primjenjivani spojevi u organskoj sintezi, ali zbog svoje biološke aktivnosti sve se češće koriste kao aktivne supstance mnogih lijekova ili kao glavni reaktanti u sintezi novih aktivnih spojeva. Na slici 2.5. prikazani su neki derivati oksima koji pokazuju određenu biološku aktivnost. Oksimski derivat **52**, dobiven reakcijom oksima i kloropropilnog derivata heterocikličkog amina, pokazuje antispazmodično i vazodilacijsko djelovanje.⁴⁸ Aminoetiloksimi, koji sadrže najmanje jedan tienilni radikal pokazuju koronarnu vazodilacijsku aktivnost. Tiofenski oksimi, poput spoja **53**, koriste se kao sredstva za smanjenje razine kolesterola u krvi.⁴⁹ Nadalje, O-(2-aminoetil) oksim **54**, dobiven reakcijom odgovarajućeg oksima i 2-brommetilamin hidrobromida, pokazuje dobro antidepresivno i sedativno djelovanje.⁵⁰ Veliki broj oksima i oksimskih derivata pokazuju visoku aktivnost u liječenju epilepsije (antikonvulzivni učinak).⁵¹ Nitro-derivati furanskih oksima istraživani su kao antibakterijska sredstva. Tako je utvrđeno da O-alkil- i O-benziloksimi furana (**55**) imaju antibakterijsko djelovanje protiv *Escherichie coli*.⁵² Derivati O-alkil- i O-acil- furanskih oksima koriste se i kao insekticidi (**56**).⁵³



Slika 2.5. Prikaz struktura oksimskih derivata s biološkom aktivnošću.

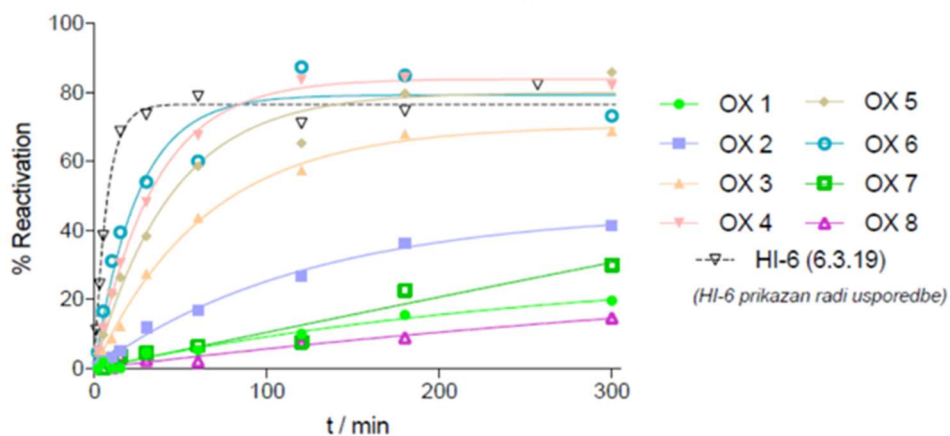
U našem laboratoriju priređen je niz neutralnih različito supstituiranih 2-tienilnih heterostilbenskih oksima **OX1-OX8** (slika 2.6.) te su na njima provedena istraživanja njihovog potencijala kao reaktivatora. Kako se vidi na slici 2.6., u ovom nizu oksima, kao glavni produkti prevladavaju *trans*-izomeri oksima s različitim konfiguracijama na C=N-OH dvostrukoj vezi, *anti*-, odnosno *syn*-. Dobiveni spojevi **OX1-OX8** sintetizirani su nizom od tri reakcijska stupnja, koji čine Wittigova reakcija, Vilsmeierovo formiliranje te prevođenjem u oksimske strukture.

Preliminarni eksperimentalni rezultati pokazali su da su oksimi **OX3-OX6** reaktivatori ciklosarinom inhibirane butirilkolinesteraze (slika 2.7.), što je izvrsna polazna informacija za sintezu novih sličnih 2-furilnih heterostilbenskih oksima **10-14**, novih potencijalnih reaktivatora kolinesteraza obuhvaćenih ovim diplomskim radom.



Slika 2.6. Strukture 2-tienilnih heterostilbenskih oksima OX1-OX8.

Reakcija reaktivacije hBChE_{WT} inhibirane ciklosarinom, pomoću OX1-OX8 oksima (0.1 mM)



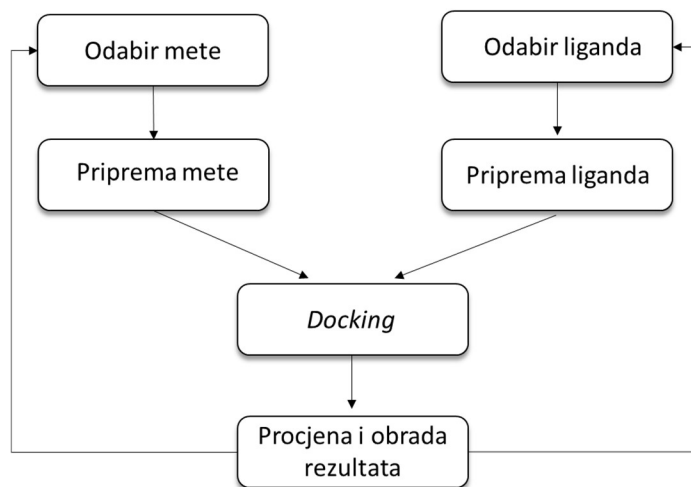
Slika 2.7. Profil reaktivacije ciklosarinom inhibirane BChE oksimima OX1-OX8 u usporedbi s reaktivacijskim potencijalom HI-6.

2.3. Računalno modeliranje

Upotrebom različitih računalnih programa omogućeno je predviđanje mogućih interakcija enzima AChE i BChE sa širokim spektrom raznih liganada, na temelju njihove trodimenzionalne strukture.¹ U bazi proteinskih struktura (PDB, engl. *Protein Data Bank*) pohranjeno je više od 160 kristalnih struktura kolinesteraza koje služe kao polazna točka u istraživanjima ovakve vrste. Osim struktura čistih kolinesteraza, u PDB-u su pohranjene i kristalne strukture kolinesteraza inhibiranih nekim organofosfornim spojevima. Međutim, svega je nekoliko struktura u kompleksu s oksimima kao što su oksimi **9**, **13** i **15**, koje bi mogle poslužiti kao smjernice u dizajniranju učinkovitih protuotrova.⁵⁴ Razlog otežanom dobivanju odgovarajućih kristala kompleksa oksima i konjugata AChE-organofosfat nalazi se u samom procesu reaktivacije, koji se odvija pri niskim temperaturama i izuzetno je brz. U svrhu istraživanja interakcija koje se javljaju tijekom reaktivacije kolinesteraza inhibiranih organofosfornim spojevima najčešće se rabi računalna metoda molekularnog pristajanja (engl. *molecular docking*).

2.3.1. Metoda molekularnog pristajanja (*Molecular Docking*)

Metodom molekularnog pristajanja previđa se najvjerojatniji položaj i orijentacija oksima u aktivnom mjestu enzima, pri čemu je enzim nepomičan, a oksimu se dopuštaju svi stupnjevi slobode rotacije.⁵⁵ Takvim se pristupom omogućuje definiranje strukturnih karakteristika potencijalno učinkovitih reaktivatora koje bi služile kao smjernice u sintezi novih oksima. Proces molekularnog pristajanja uključuje dva osnovna koraka, predviđanje konformacije liganda, njegov položaj i orijentaciju unutar aktivnog mjesta enzima te procjenu afiniteta vezanja.⁵⁶

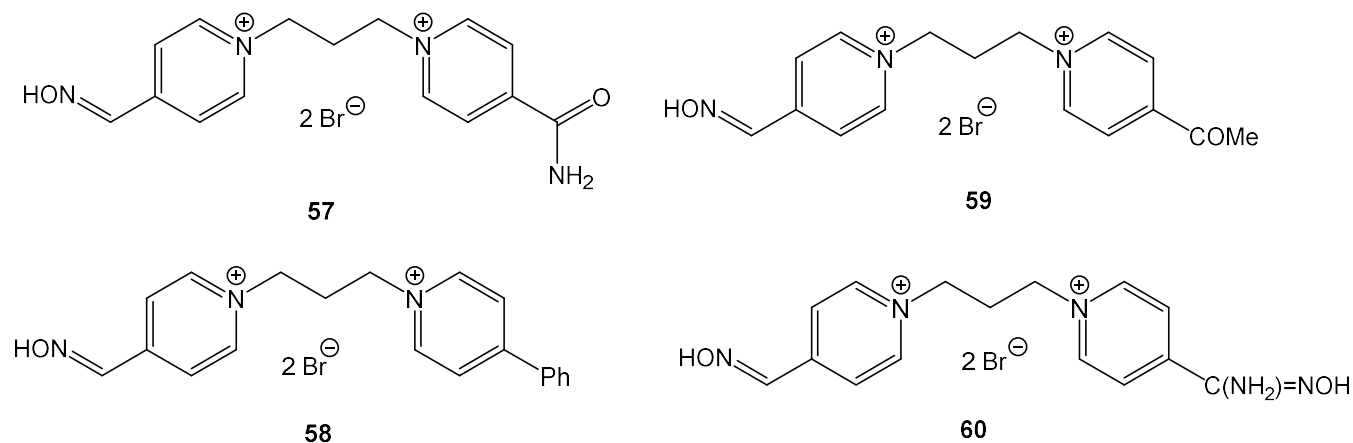


Slika 2.8. Ključni koraci u metodi molekularnog pristajanja.⁵⁷

Na slici 2.8. prikazani su ključni koraci u metodi molekularnog pristajanja. Prije samog *docking-a* potrebno je definirati 3D strukture enzima i liganda te ih pripremiti u skladu sa zahtjevima metode koja se koristi. Način vezanja liganda za receptor definiran je varijablama stanja. One se sastoje od položaja (x-, y- i z- koordinate), orijentacije (Eulerovi kutovi, kut osi ili kvaternion) i konformacije liganda (trozijski kutovi za svaku rotacijsku vezu). Model čvrstog pristajanja (engl. *Rigid body docking*), u kojem su ligandi i enzimi fiksirani, puno je brža metoda od one u kojoj se ligandi tretiraju kao fleksibilna tijela. Međutim, ukoliko konformacija liganda nije točna, biti će manja vjerojatnost pronalaska komplementarnog položaja za vezanje pomoću te metode.

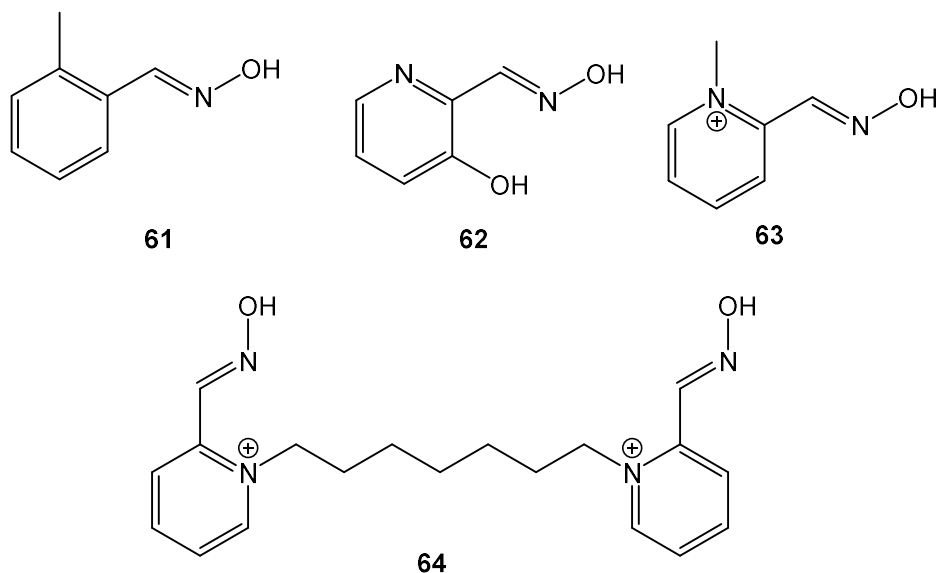
Strategije za razvoj učinkovitih lijekova mogu se podijeliti na dva osnovna pristupa, kinetički i strukturni. Kinetički pristup uključuje dva stupnja adicijsko-eliminacijskih reakcija, u kojima se molekula lijeka veže na AChE inhibiranu organofosfatima te kao konačan produkt nastaje fosforilirani lijek i reaktivirani enzim. Strukturni pristup povezan je sa strukturom molekule lijeka i AChE te je temeljen na interkacijama koje nastaju između njih.⁵⁸ Metode pretraživanja najstabilnijeg položaja za vezanje liganda i enzima mogu se podijeliti u dvije glavne kategorije, sustavne i stohastičke. Sustavne metode su determinističke, dok stohastičke metode pretraživanja iterativno vrše nasumične promjene varijabli stanja sve dok se ne zadovolje određeni parametri. Drugim riječima, stohastičke metode oslanjaju se na element slučajnosti i prikladnije su za predviđanje fleksibilnog spajanja liganda i enzima.⁵⁷

Na slici 2.9. prikazani su oksimi **57-60** na kojima je provedeno istraživanje reaktivacije hAChE (engl. *Human AChE*) inhibirane tabunom. Nakon što se eksperimentalno potvrdilo svojstvo reaktivacije, provedena su računska ispitivanja, tj. *docking*.⁵⁹



Slika 2.9. Prikaz oksima **57-60** na kojima je provedeno ispitivanje reaktivacije tabunom inhibirane AChE.

Najbolji rezultati dobiveni su za spoj **57**, koji ima najmanju energiju vezanja od $-43.011 \text{ kJ mol}^{-1}$ između aromatskog prstena s oksimskom skupinom i tri aminokiselinska ostatka unutar anionskog mjesta enzima (IAS) (Tyr337, Phe338 i Tyr341). Drugi aromatski prsten spoja **57** smješten je između četiri aminokiselinska ostatka (Tyr72, Tyr124, Trp286 i Phe297) u perifernom anionskom mjestu (PAS). Spoj **58**, s najnižom energijom vezanja od 34.9 kJ mol^{-1} , pokazuje drugačiju interakciju s mAChE od prethodno spomenutog oksima. Njegov aromatski prsten na kojeg je vezana oksimska skupina pokazuje kation- π interakcije s dva aminokiselinska ostatka (Phe338 i Tyr341) i interakciju s Trp286 u PAS. Drugi aromatski prsten na kojem je vezan fenil, u interakciji je s Trp286 u PAS, dok se sama fenilna skupina nalazi u blizini His287. Za spoj **59** detektirana je najmanja energija vezanja od $30.08 \text{ kJ mol}^{-1}$, a interakcije su slične onima za spoj **58**. Njegov aromatski prsten s oksimskom skupinom stabiliziran je kation- π interakcijama (Phe297, Phe338 i Tyr341) u IAS-u. Aromatski prsten s metilkarbonilnom skupinom u interakciji se s Trp286 u PAS-u, dok je metilkarbonilna skupina vodikovom vezom povezana sa Ser293. Spoj **60** ima najnižu energiju vezanja od $42.93 \text{ kJ mol}^{-1}$, a aromatski prsten s oksimskom skupinom stabiliziran je kation- interkacijama (Tyr337, Phe338 i Tyr341) unutar IAS. Aromatski prsten koji sadrži amidoksimski dio unutar perifernog anionskog mjesta okružen je aminokiselinskim ostacima Tyr72, Tyr124, Trp286 i Phe297. Na temelju dobivenih rezultata, vidljivo je da spoj **57** pokazuje najveće svojstvo reaktivacije, a s obzirom na to da je pojava interakcija poput kation- π interakcija i vodikovih veza ključni čimbenik koji utječe na reaktivaciju, spojevi **58-60** mogu pomoću u daljnjem razvoju reaktivatora hAChE.⁵⁹



Slika 2.10. Prikaz struktura nenabijenih oksima **61** i **62** i oksima s nabojem, **63** i **64**.

Osim nabijenih molekula, istraživanja su provedena i na oksimima bez naboja.⁵⁸ Na slici 2.10. prikazane su strukture nenabijenih oksima **61** i **62**, te strukture oksima s nabojem, **63** i **64**. Na navedenim oksimima ispitivan je postupak reaktivacije AChE inhibirane tabunom, s kinetičkog i strukturnog stajališta. Inhibirani enzim optimiziran je na razini teorije MP2/6-31+G(d)//M05-2X/6-31G(d), u vodenom mediju. Optimizacije su bile provedene pomoću programa *Gaussian 09*. Izračunata ploha potencijalne energije pokazuje da su neutralni oksimi bolji reaktivatori u usporedbi s nabijenim protuotrovima. Osim nižih energija, nenabijeni oksimi hidrofilne su prirode (pozitivan LogP) i imaju mogućnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru.

3. REZULTATI I RASPRAVA

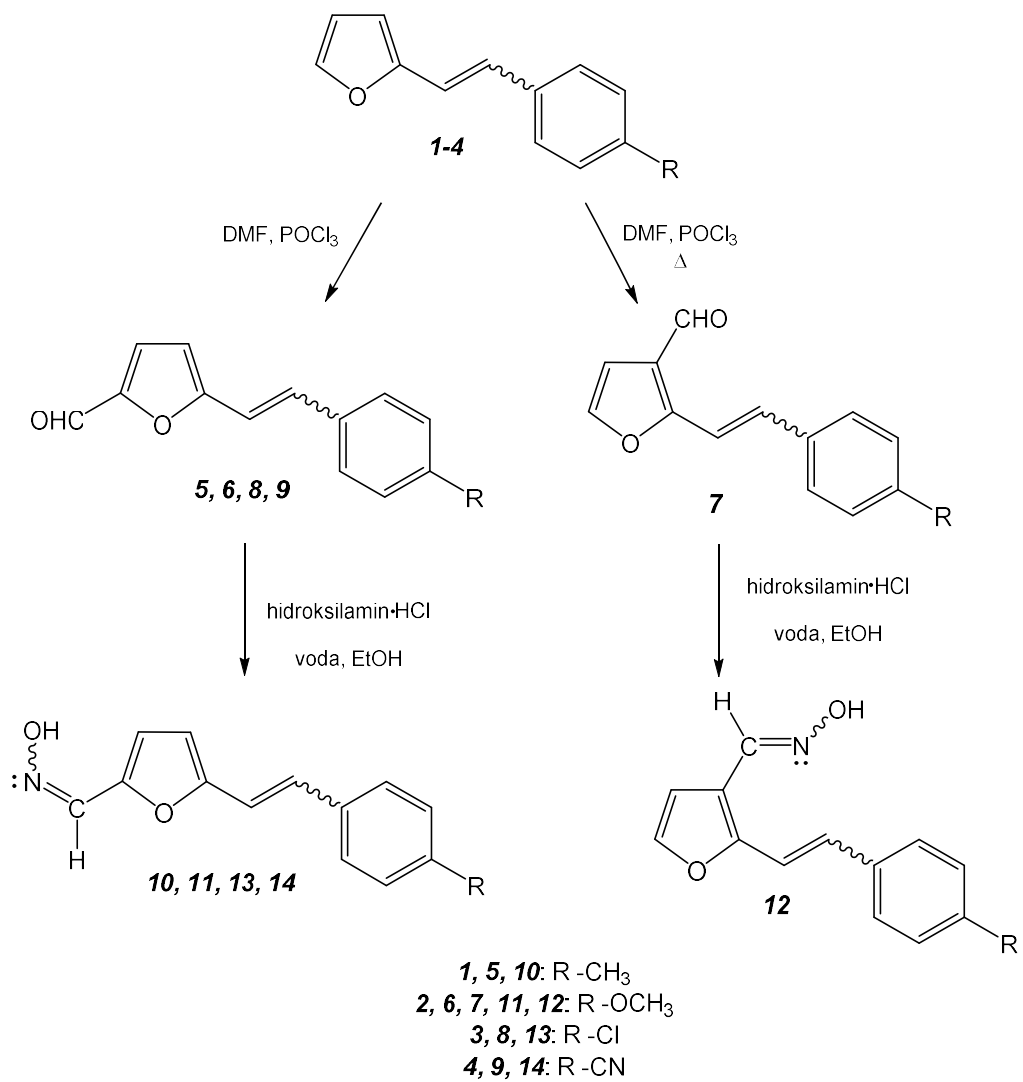
3.1. Uvod

Prisutnost acetilkolina (ACh) u organizmu važna je zbog prijenosa živčanih impulsa, ali prekomjerno nakupljanje ima negativne učinke na zdravlje. Acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE) enzimi su koji smanjuju koncentraciju ACh u krvi i tkivima. Zbog svoje rasprostranjenosti u biljnom i životinjskom svijetu te važne uloge u organizmu, oba enzima se intenzivno istražuju unutar područja biokemije i toksikologije.¹

Organofosforni spojevi (OP) često se koriste kao bojni otrovi, a poznatiji predstavnici su tabun i ciklosarin.²¹⁻²³ Po kemijskoj strukturi OP spadaju pod estere, anhidride ili halogenide, a osnovu im čini peterovalentni atom fosfora s kovalentno vezanim kisikom ili sumporom. Od enzima koje OP spojevi inhibiraju najbitnije se serinske hidrolaze kod kojih dolazi do nukleofilne supstitucije između OP spoja i serina u aktivnom mjestu enzima. Neke od najvažnijih serinskih hidrolaza su upravo acetilkolinesteraza i butirilkolinesteraza.¹⁸ Da bi se enzimu, u čijem je aktivnom mjestu kovalentno vezan OP, vratila enzimaska aktivnost potrebno je koristiti kemijske spojeve sa svojstvom reaktivacije. Početak razvoja oksimskih reaktivatora nastupio je kada je Jandorf (1951.) uočio da hidroksilamin (NH₂OH) u otopini brzo reagira s OP spojevima i ima detoksifikacijski učinak.¹⁹ Furanski oksimi često su podvrgnuti raznim kemijskim reakcijama, u svrhu dobivanja novih derivata s izraženom biološkom aktivnošću, primjerice oksimskih etera.³¹

U svrhu ovog rada sintetizirani su oksimski derivati furostilbena **10-14**. Prvi korak sinteze bila je Wittigova reakcija u kojoj su nastale smjese *cis*- i *trans*-izomera spojeva **1-4**, koji su potom u drugom stupnju reakcije podvrgnuti Vilsmeier-Haackovom formiliranju, dajući spojeve **5-9**. Konačno, navedeni aldehidi prevedeni su u oksime (shema 3.1.). Sintetizirani spojevi spektroskopski su okarakterizirani pomoću ¹H i ¹³C NMR spektara.

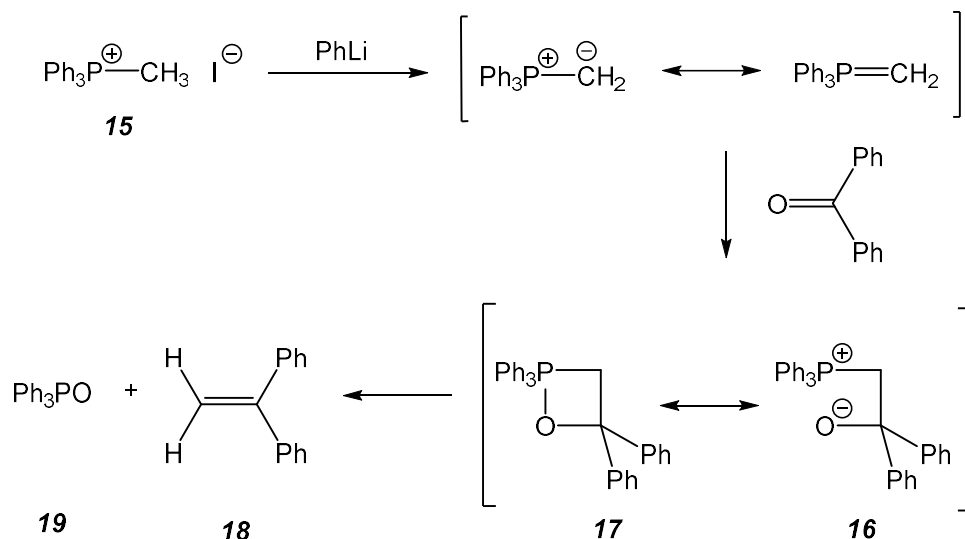
U svrhu dobivanja informacija o elektronskoj strukturi i termodinamičkoj stabilnosti dobivenih oksimskih derivata **10-14** provedena su računska ispitivanja. Također, provedeno je računalno ispitivanje mehanizma za reaktivaciju kolinesteraza, pri čemu su kao reaktivatori ispitivani sintetizirani oksimski derivati furostilbena.



Shema 3.1. Reakcijski put dobivanja oksimskih derivata furostilbena.

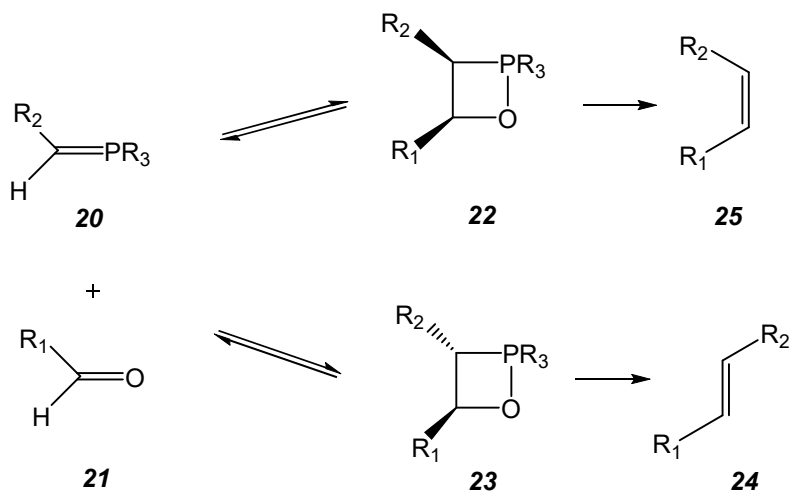
3.2. Wittigova reakcija

Wittig i Geissler⁶⁰ 1953. godine opisali su reakciju fosfornog ilida s aldehidom ili ketonom, koja se koristi i danas (shema 3.2.). Kao produkti navedene reakcije nastaju odgovarajući alken **18** i fosfin-oksid **19**. Takva reakcija je vrlo općenita i prikladna je za sintezu niza alkena s dobrom stereoselektivnošću. Početni fosfonijevi ilidi nastaju dodavanjem prikladne baze u odgovarajuću fosfonijevu sol **15**.⁶¹



Shema 3.2. Mehanizam Wittigove reakcije.⁶⁰

Dugo se smatralo da mehanizam Wittigove reakcije uključuje dva međuprodukta, kako je to prikazano na shemi 3.2., betain **16** i oksafosfetan **17**, od kojih je produkt **16** dobiven u većem iskorištenju i imao je važniju ulogu u cijelom mehanizmu reakcije. Dodatna istraživanja provedena su pri nižim temperaturama, na kojima kao većinski produkt nastaje oksafosfetan. Ta pretpostavka dodatno je potkrijepljena izračunima koji dokazuju da su oksafosfetani niže energije od odgovarajućih betaina.⁶⁰ Na temelju tog otkrića, definiran je novi mehanizam Wittigove reakcije, prikazan na shemi 3.3. Navedeni mehanizam objašnjava stereoselektivnost same reakcije.

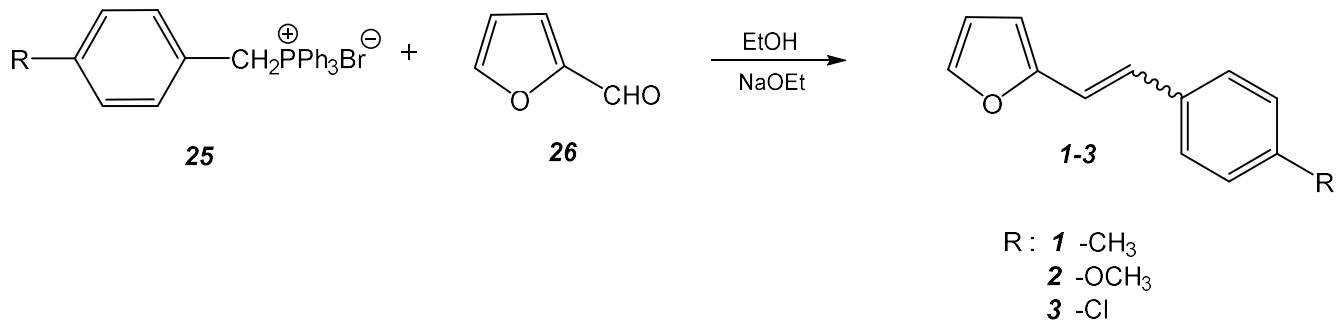


Shema 3.3. Prikaz mehanizam Wittigove reakcije u kojoj je glavi međuprodukt oksafosfetan.

Stereoselektivnost Wittigove reakcije izravno je povezana s mehanizmom. Reakcijom karbonilnog spoja **21** s ilidom **20** nastaju *cis*- (**22**) i *trans*-oksaosfetan (**23**) koji prelaze u odgovarajuće *E*- (**24**) i *Z*-alkene (**25**). Zbog mehanizma i stereokemije, kao i same stabilnosti produkata, u većem iskorištenju gotovo uvijek nastaje *E*-izomer, dobiven iz stabilnijeg *trans*-oksaosfetan. Takav omjer izomera vidljiv je i kod sinteze spojeva **1-4**, u kojima *trans*-izomeri nastaju u većim iskorištenjima.

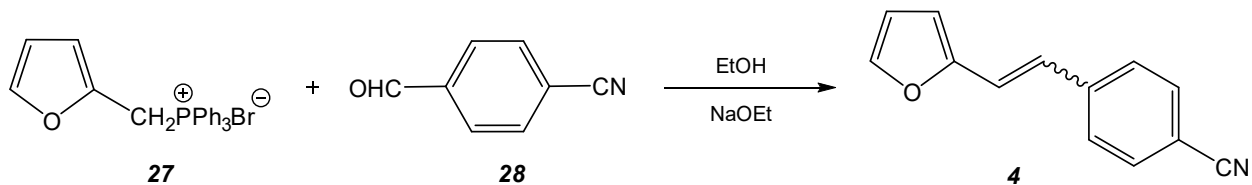
3.2.1. Sintaza heterostilbena **1-4**

Furanski heterostilbeni **1-3** sintetizirani su Wittigovom reakcijom, prikazanom na shemi 3.4. Kao polazni reaktant korištena je fosfonijeva sol **25** i furanski aldehid **26**, uz prisutnost natrijevog etoksida NaOEt kao baze te etanola kao otapala. Kao produkti reakcije dobivene su smjese *cis*- i *trans*-izomera.



Shema 3.4. Sintaza novih derivata furostilbena.

Furanski heterostilben **4** također je sintetiziran Wittigovom reakcijom, korištenjem furanske soli **27** i aldehida **28**, uz prisutnost natrijevog etoksida kao baze te etanola kao otapala. Ponovno nastaje smjesa *cis*- i *trans*-izomera (shema 3.5.).

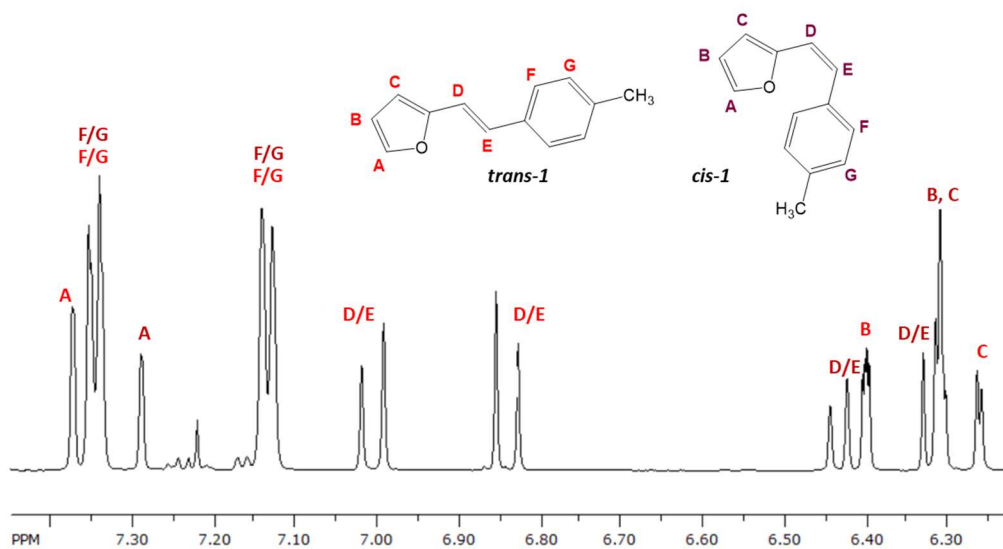


Shema 3.5. Sinteza derivata **4** iz furanske soli **27** i aldehida **28**.

Dobiveni izomeri **1-4** odijeljeni su pomoću kolonske kromatografije. Kolona je punjena silikagelom, a kao eluens koristila se smjesa petroleter/dietil-eter promjenjiva omjera. Za dodatno pročišćavanje i odvajanje izomera korištena je tankoslojna kromatografija sa silikagelom kao stacionarnom fazom, a kao otapalo korištena je smjesa petroleter/dietil-eter promjenjiva omjera.

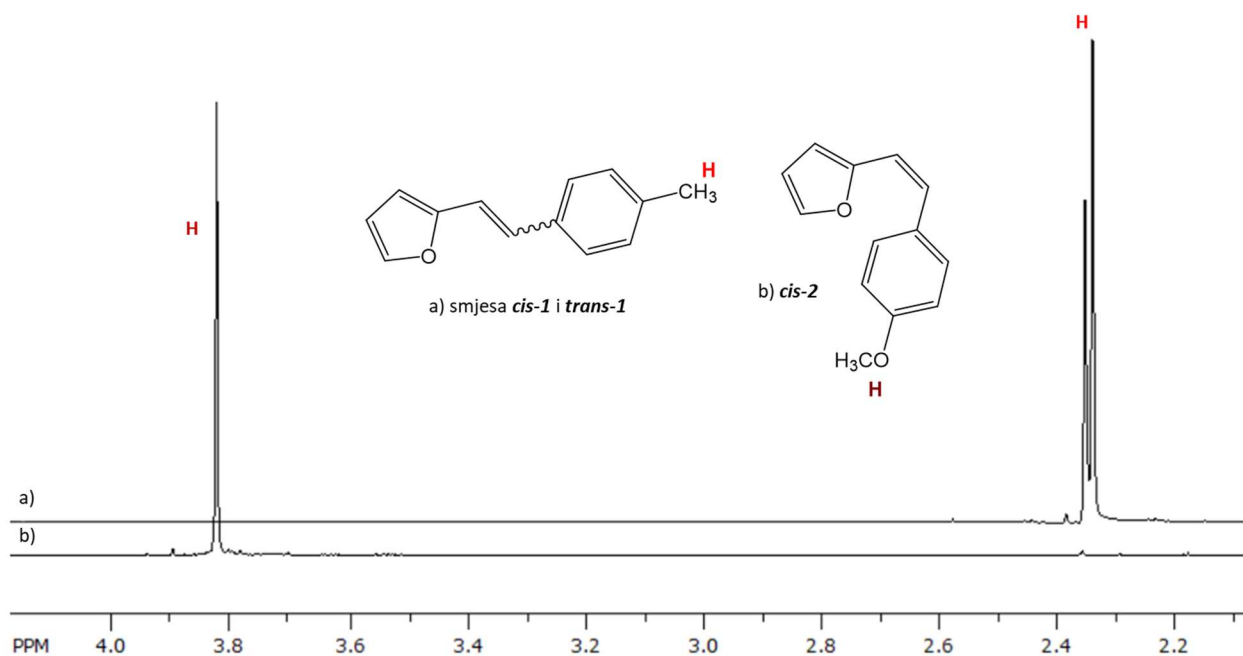
3.2.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva **1-4**

Dobiveni *cis*- i *trans*-izomeri furostilbenskih derivata **1-4** izolirani su iz reakcijske smjese uzastopnim kromatografskim odjeljivanjem na koloni i tankom sloju, a njihove strukture potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom.



Slika 3.1. ^1H NMR spektar smjese izomera **trans-1** i **cis-1**.

Na slici 3.1. prikazan je ^1H NMR spektar smjese izomera **trans-1** i **cis-1**. Glavna razlika u kemijskim pomacima za dva navedena izomera vidljiva je kod signala za protone dvostruke veze, H_D i H_E . **Trans**-izomere karakterizira konstanta sprege od 16 Hz, dok je kod **cis**-izomera ona nešto manja, oko 12 Hz. Osim protona dvostruke veze, protoni furanskog prstena također imaju karakteristične kemijske pomake i oblike signala. Signal za proton H_A , koji je vezan na ugljikov atom uz kisik, nalazi se na najvećem kemijskom pomaku, dok se signali za protone H_B i H_C nalaze pri nižim kemijskim pomacima, s obzirom na to da ne osjećaju utjecaj kisika. Konstanta sprege koja se javlja između protona H_A i H_B iznosi oko 1.5 Hz, dok je ona između protona H_B i H_C oko 3 Hz. Oblik signala za protone H_A i H_C je dublet, a oblik za proton H_B dublet dubleta, što se očituje i iz navedenih konstanti sprege.

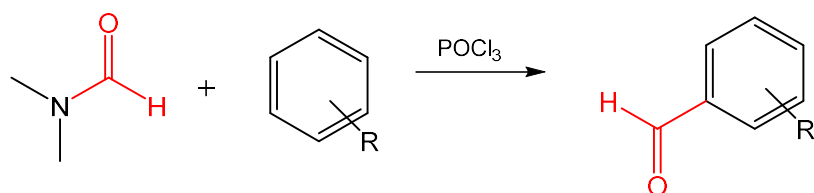


Slika 3.2. ^1H NMR spektar smjese izomera **cis-1** i **trans-1** (a) i **cis-2** (b).

Na slici 3.2. prikazan je dio ^1H NMR spektar u kojem se nalaze signali za alifatske protone izomera **cis-1**, **trans-1** i **cis-2**. Vidljiva je značajna razlika u kemijskom pomaku za proton H_H kod molekule **cis-2**, koji se nalazi na 3.82 ppm. Takav kemijski pomak posljedica je blizine kisikovog atoma i aromatskog prstena koji značajno pomiču signal protona H_H .

3.3. Vilsmeier-Haackovo formiliranje

Vilsmeier-Haackova reakcija (shema 3.6.) važna je metoda za sintezu derivata aldehida. Reakcija uključuje elektrofilnu supstituciju prikladnog ugljičnog nukleofila s klorometileniminijevom soli. Prikladni ugljični nukleofili su općenito aromatski spojevi bogati elektronima poput *N,N*-dimetilnilina, derivati alkena poput stirena ili spojevi poput 2,4,6-trinitrotoluena. Hidroliza iminijevih soli, nastalih reakcijom između nukleofila i klorometileniminijeve soli, daje derivate aldehida.

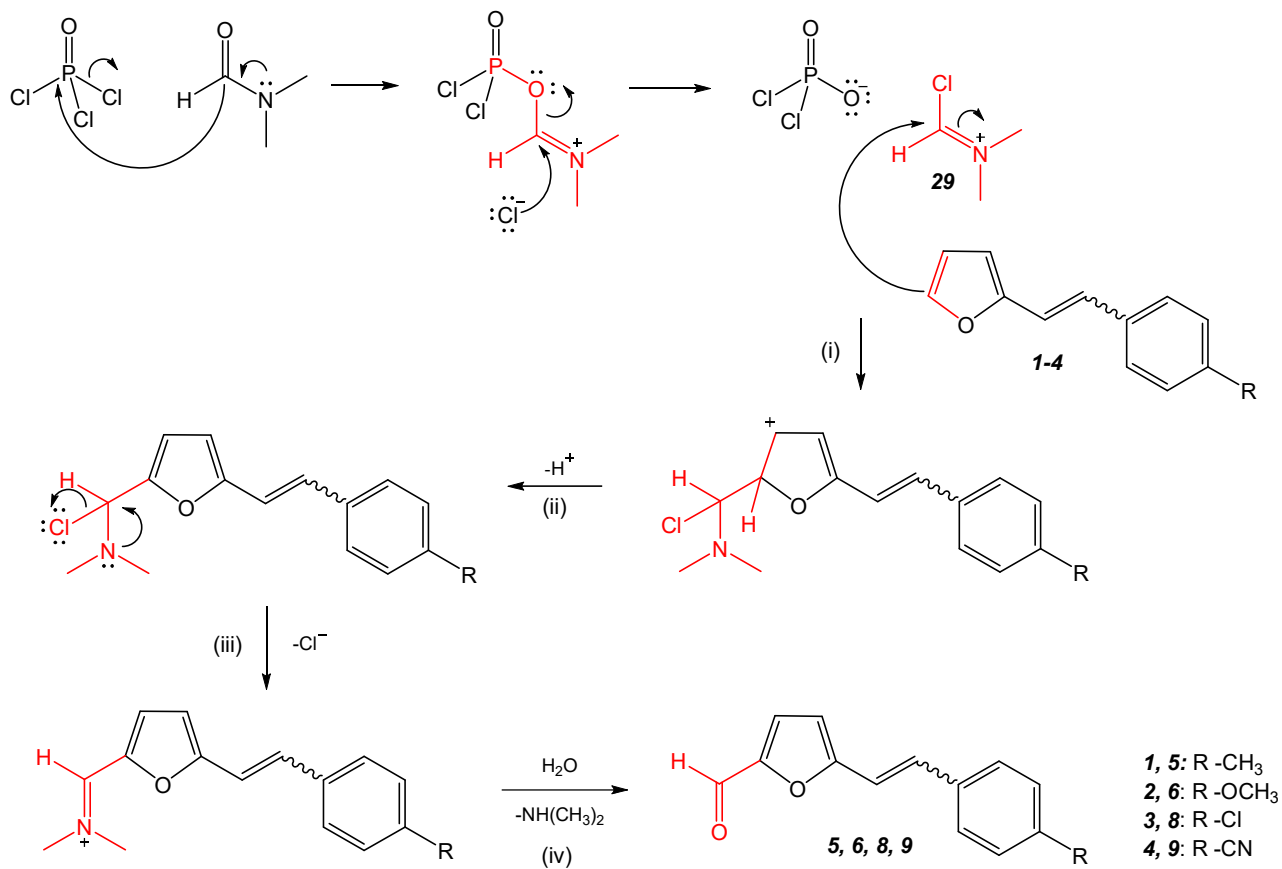


Shema 3.6. Reakcija Vilsmeier-Haackovog formiliranja.

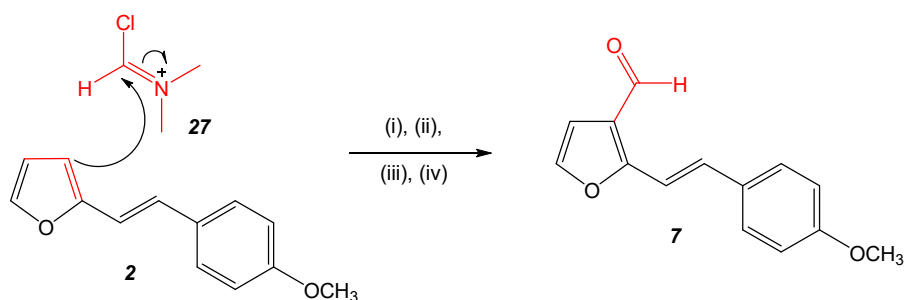
Derivati pirola, furana i tiofena stvaraju derivate aldehida pomoću navedenog Vilsmeier-Haackovog formiliranja u visokom iskorištenju. Supstitucija se najčešće događa na položajima 2 ili 5, osim ako postoje odgovarajuće blokirajuće skupine na samom heterocikličkom prstenu ili u njegovoj blizini. U tom slučaju navedene skupine mogu usmjeriti supstituciju na neke druge položaje. Deaktivirajuće skupine, poput halogena ili estera, ne isključuju supstituciju zbog velike reaktivnosti samog heterocikličkog prstena.⁶²

3.3.1. Sintaza aldehida **5-9**

Smjese *cis*- i *trans*-produkata Wittigove reakcije **1-4** podvrgnute su reakciji Vilsmeier-Haackovog formiliranja. Mehanizam reakcije prikazan je na shemi 3.7. Kao početni reaktanti koriste se POCl_3 i DMF koji prvotno tvore Vilsmeierov reagens **29**, koji potom sudjeluje u reakciji s heterostilbenima **1-4**. U reakcijskoj posudi, nakon miješanja na sobnoj temperaturi, nastaju *cis*- i *trans*-izomeri **5**, **6**, **8** i **9**. U tom je slučaju reakcija odvijala na ugljikovom atomu u položaju 5 furanskog prstena. U slučaju produkta **7**, reakcija formiliranja odvila se na položaju 3 furanskog prstena, zbog grijanja reakcijske smjese (shema 3.8.).



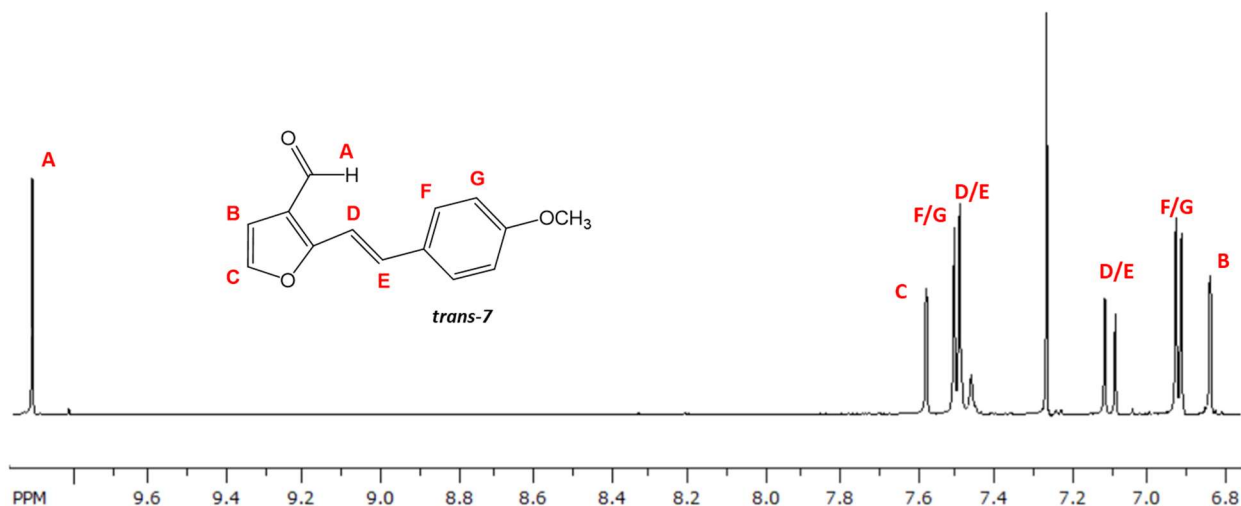
Shema 3.7. Mehanizam dobivanja spojeva **5**, **6**, **8** i **9** reakcijom Vilsmeier-Haackovog formiliranja, pri sobnoj temperaturi.



Shema 3.8. Mehanizam dobivanja spoja **7** reakcijom Vilsmeier-Haackovog formiliranja, uz zagrijavanje i suvišak reagensa, u smjesi sa 2,5-disupstituiranim derivatom **6**.

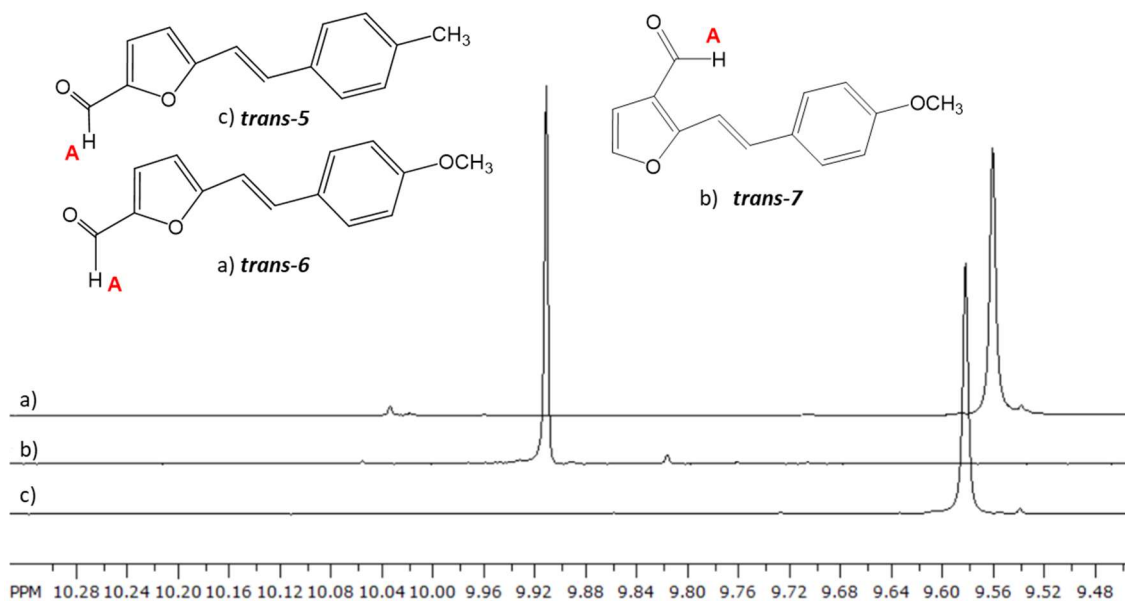
3.3.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva 5-9

Na temelju dobivenih rezultata spektroskopske analize produkata **5-9** (asignacijom ^1H NMR spektara), vidljivo je da su *trans*-izomeri početnih spojeva **1-4** uspješnije reagirali u provedenom formiliranju u odnosu na *cis*-izomere.



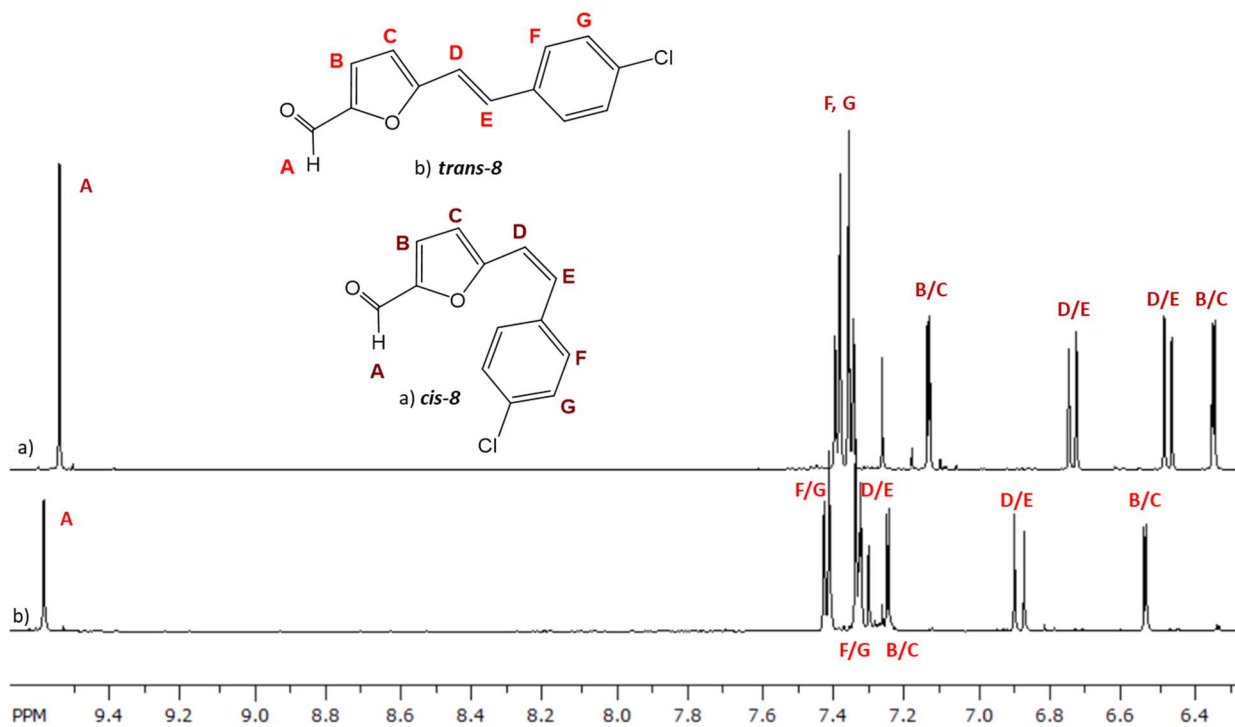
Slika 3.3. Prikaz dijela ^1H NMR spektra molekule *trans*-7.

Na slici 3.3. prikazan je dio ^1H NMR spektra derivata *trans*-7. Navedeni izomer dobiven je grijanjem reakcijske smjese prilikom sinteze aldehida Vilsmeier-Haackovim formiliranjem iz molekule **2**. Na najvišim kemijskim pomacima nalazi se signal za proton H_A (9.88 ppm), koji odgovara protonu aldehidne skupine. Derivat *trans*-7 jedini je od sintetiziranih aldehida kod kojeg se reakcija formiliranja odvila na položaju 3 furanskog prstena. To je vidljivo iz konstanti sprega za protone H_B ($J = 1.5$ Hz) i H_C ($J = 1.2$ Hz), čije malene vrijednosti odgovaraju supstituciji na položajima 2 i 3 furanskog prstena. Slika 3.4. prikazuje dijelove ^1H NMR spektara za derivate *trans*-5, *trans*-6 i *trans*-7, koji odgovaraju području na kojem se nalazi proton aldehidne skupine. Kod derivata *trans*-5 i *trans*-6, čiji su furanski prsteni supstituirani u položajima 2 i 5, signali za protone H_A nalaze se na oko 9.6 ppm, dok se signal za isti proton kod molekule *trans*-7 nalazi na već spomenutih 9.88 ppm. Znatno veći kemijski pomak posljedica je položaja protona H_A kod derivata *trans*-7, koji se nalazi bliže heterostilbenskog sustava.



Slika 3.4. Dijelovi ^1H NMR spektara za derivate *trans-5*, *trans-6* i *trans-7*.

Kao što je ranije navedeno, u reakcijama formiliranja u većem iskorištenju nastaju *trans*-izomeri. To pravilo vrijedi za sve molekule osim za molekulu **8**, kod koje *cis*-izomer nastaje u većem iskorištenju (20,8%) od *trans*-izomera (10,21%). Dijelovi ^1H NMR spektara navedenih derivata prikazani su na slici 3.5. Glavna razlika vidljiva je u protonima dvostruke veze heterostilbenskog sustava, H_D i H_E . Protoni dvostruke veze u molekuli *cis-8* karakterizirani su konstantom sprege od 13.5 Hz, dok konstanta sprege kod protona H_D i H_E u molekuli *trans-8* iznosi 15.9 Hz.

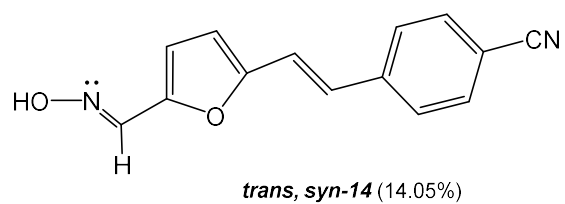
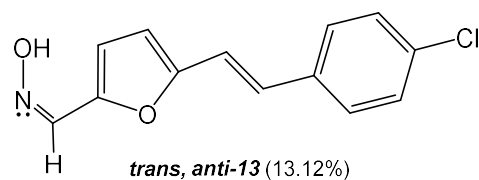
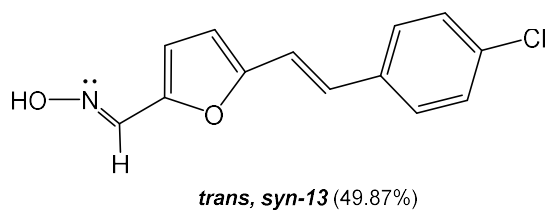
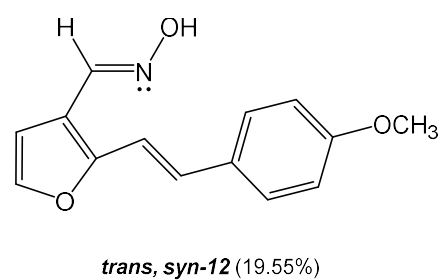
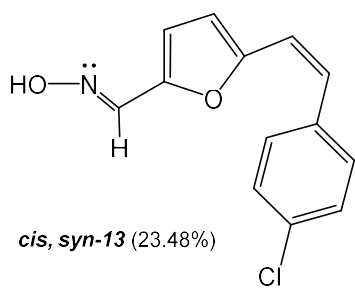
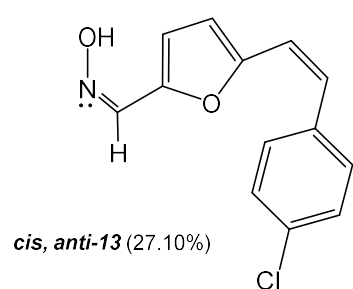
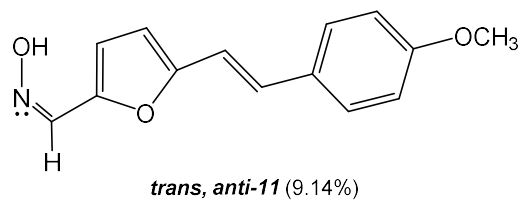
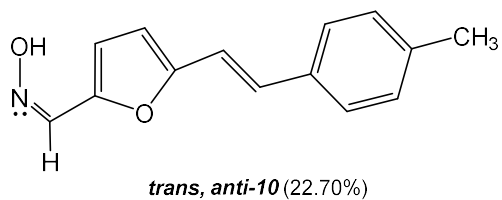
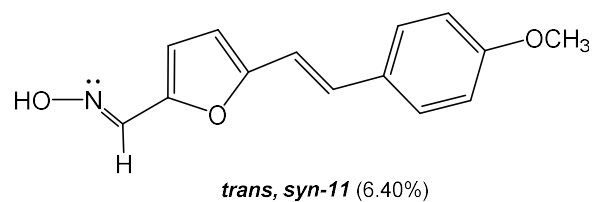
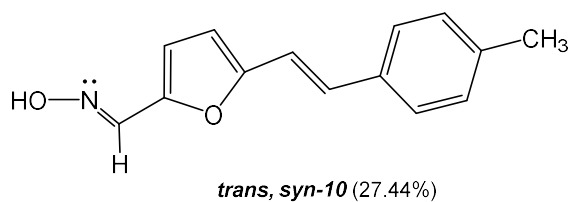


Slika 3.5. Prikaz dijelova ^1H NMR spektara za molekule **trans-8** i **cis-8**.

3.4. Sinteza novih oksimskih derivata furostilbena

Prethodno sintetizirani aldehidi **5-9** prevedeni su u oksimske derivate **10-14**. Reakcija sinteze oksima započinje korištenjem $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ i smjese $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ kao otapala. Na slici 3.6. prikazani su sintetizirani oksimski derivati, kao i iskorištenja u kojima nastaju. Na temelju prikazanih struktura vidljivo je da se molekule javljaju u dva izomerna oblika, *E*- ili *anti*- i *Z*- ili *syn*-izomer. *Anti*-izomeri karakterizirani su s položajem $-\text{OH}$ skupine i vodika, koji se nalaze s različitih strana dvostruke veze ugljika i dušika, dok se kod *syn*-izomera nalaze s iste strane dvostruke veze.

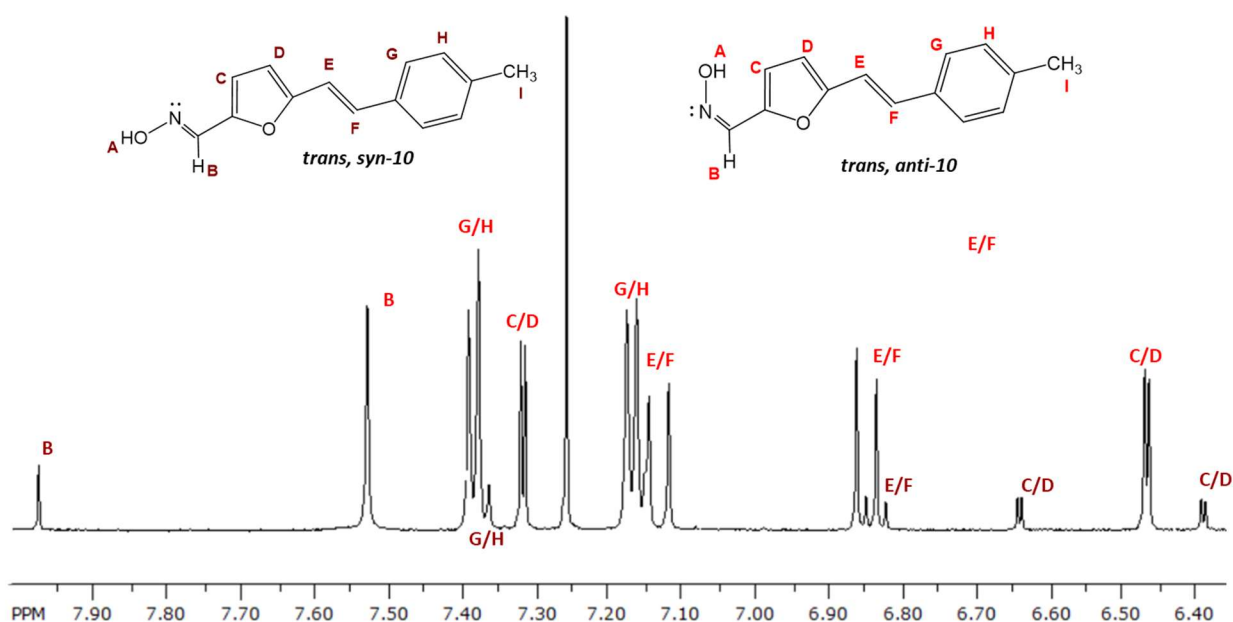
Reakcijom prevođenja aldehida u oksime mogu nastati četiri moguća produkta. S obzirom na položaj etenske skupine sintetizirani derivati mogu biti *cis*- ili *trans*-, a s obzirom na položaj elektronskog para dušika unutar oksimske skupine, odnosno položaj $-\text{OH}$ skupine i vodika na dvostrukoj vezi između ugljika i dušika, mogu biti *syn*- ili *anti*-. Na slici 3.6. prikazano je 10 sintetiziranih i okarakteriziranih derivata. Ostali izomeri spojeva **10-12** i **14** nisu dobiveni u čistom stanju ili ne nastaju uopće, te iz tog razloga nisu asignirani.



Slika 3.6. Prikaz struktura sintetiziranih oksimskih derivata furostilbena **10-14** (uz navedena iskorištenja na izoliranim spojevima).

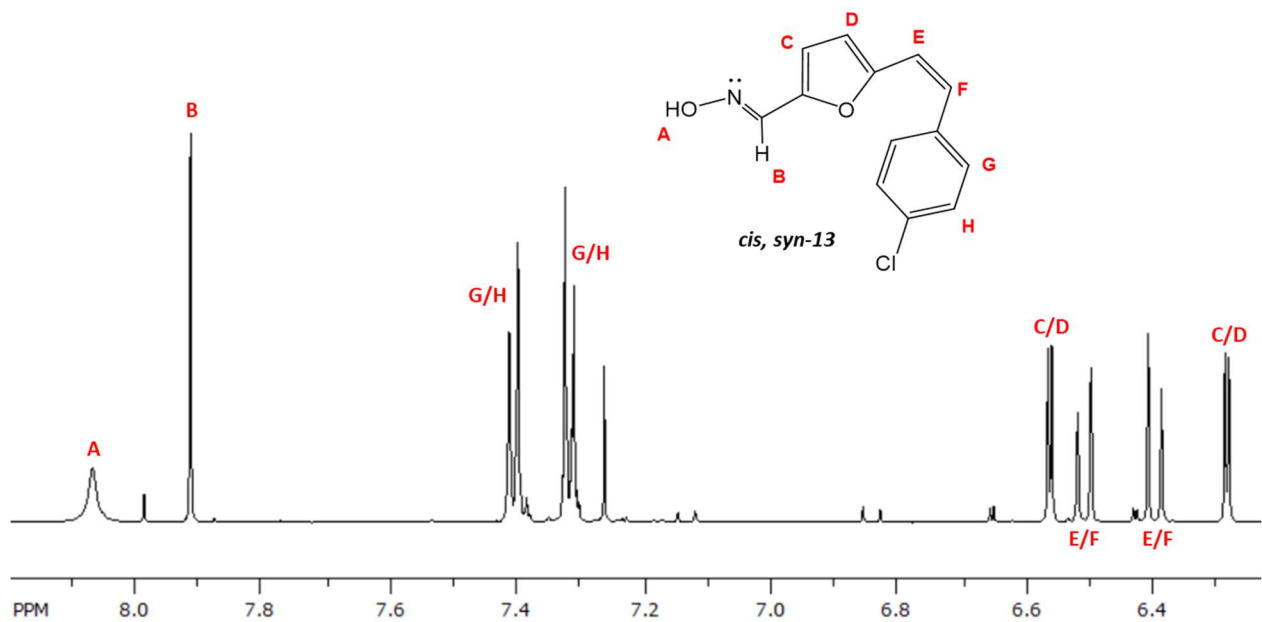
3.4.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva **10-14**

Slika 3.7. prikazuje dio ^1H NMR spektra za smjesu spojeva **trans, syn-10** i **trans, anti-10**. Signal za H_B proton u **trans, syn**-izomeru nalazi se na najvećem kemijskom pomaku, od oko 8 ppm, dok se signal za isti proton kod molekule **trans, anti** nalazi na kemijskom pomaku od 7,55 ppm-a. Navedeni kemijski pomaci protona H_B osnovna su razlika u ^1H NMR spektrima kod **syn**- i **anti**-izomera. Također, na razliku upućuju i protoni furanskog prstena, H_C i H_D . Kod **trans, syn-10** izomera dva dubleta s konstantnom sprege od 3.5 Hz nalaze se na kemijskim pomacima od 6.64 ppm i 6.38 ppm, dok se kod **trans, anti-10** izomera dva dubleta s jednakom konstantnom sprege nalaze na kemijskim pomacima od 7.31 ppm i 6.46 ppm.

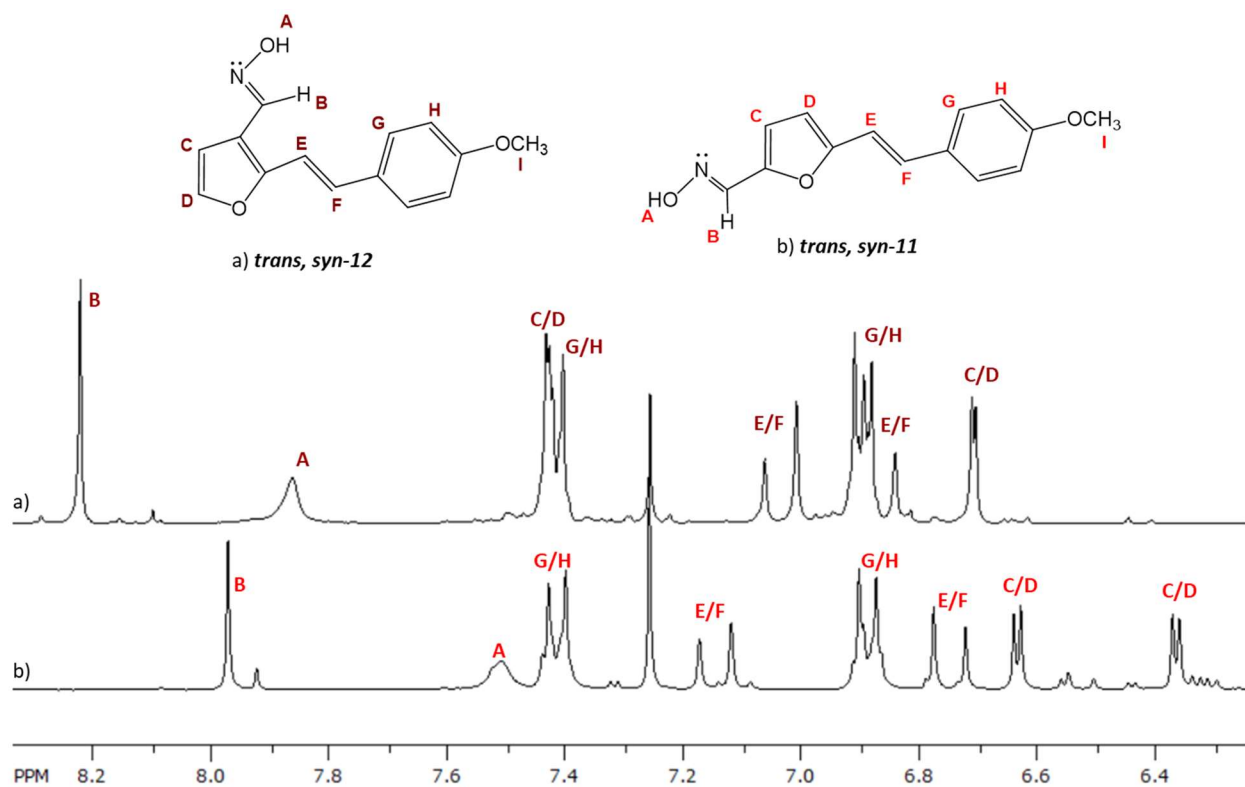


Slika 3.7. Prikaz dijela ^1H NMR spektra za smjesu spojeva **trans, syn-10** i **trans, anti-10**.

Na slici 3.8. prikazan je aromatski dio ^1H NMR spektra za molekulu **cis, syn-13**, jedini izolirani **cis**-izomer (uz **cis, anti-13**) u sintetiziranom nizu oksimskih heterostilbena. Signal za proton H_B na oko 7,9 ppm upućuje na to da se radi o **syn**-izomeru, kao i položaji furanskih protona H_C i H_D . Na priloženom ^1H NMR spektru vidljiv je i signal za kiseli proton (*board*) H_A , te signali za protone dvostruke veze, H_E i H_F s karakterističnom konstantom sprege za **cis**-izomere, od 12,5 Hz.

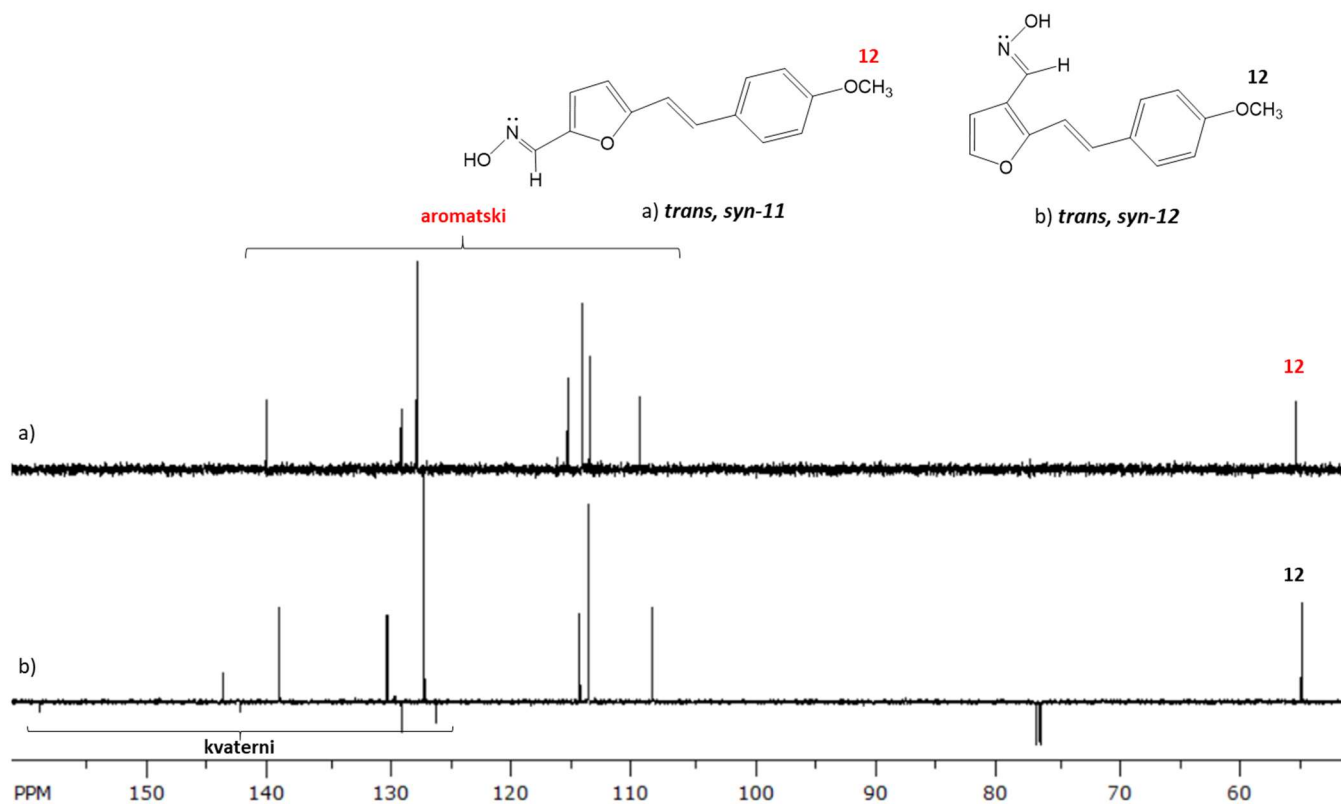


Slika 3.8. Prikaz dijela ¹H NMR spektra za spoj *cis, syn-13*.



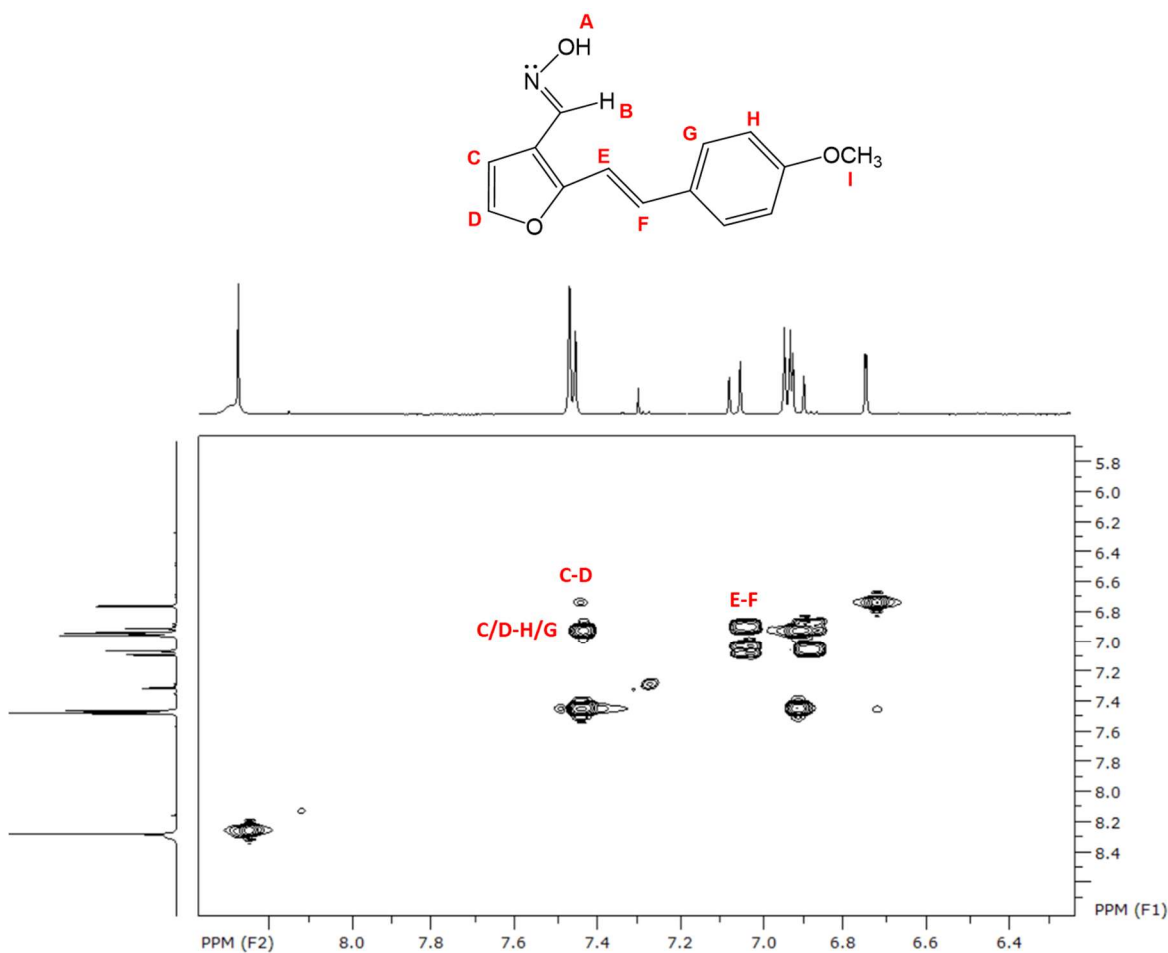
Slika 3.9. Prikaz dijela ¹H NMR spektra za spojeve *trans, syn-11* i *trans, syn-12*.

Slika 3.9. prikazuje dva usporedna ^1H NMR spektra za molekule **trans, syn-11** i **trans, syn-12**. Furanski prsten u molekuli **trans, syn-12** supstituiran je na položajima 2 i 3, za razliku od furanskog prstena molekule **trans, syn-11** koji je, kao i kod ostalih sintetiziranih derivata, supstituiran na položajima 2 i 5. Vidljiva razlika u strukturi očituje se na ^1H NMR spektrima, prema položajima protona furanskog prstena H_C i H_D te njihovih konstanti sprega. Kod 2,3-disupstituiranog furanskog prstena karakteristična konstanta sprega između H_C i H_D iznosi od 1.5 do 1.9 Hz, dok je kod 2,5-disupstituiranog furanskog prstena konstanta sprega nešto veća i iznosi 3.5 Hz. Također, signal za proton H_B kod 2,3-disupstituiranog derivata, zbog blizine heterostilbenskog sustava, pomaknut je prema većim kemijskim pomacima.



Slika 3.10. Prikaz dijela APT spektra za spojeve **trans, syn-11** i **trans, syn-12**.

Osim ^1H NMR spektara, za karakterizaciju sintetiziranih oksima snimljeni su i ^{13}C NMR spektri (APT). Na slici 3.10. prikazan je dio APT spektra za molekule **trans, syn-11** i **trans, syn-12**. Na jednakom kemijskom pomaku (55 ppm) nalaze se signali za ugljikov atom C_{12} , a područje od 105 ppm do 160 ppm karakteristično je za aromatske C-atome. Kvaterni ugljikovi atomi nalaze se s donje strane APT spektra i kod derivata **trans, syn-11** nisu vidljivi.



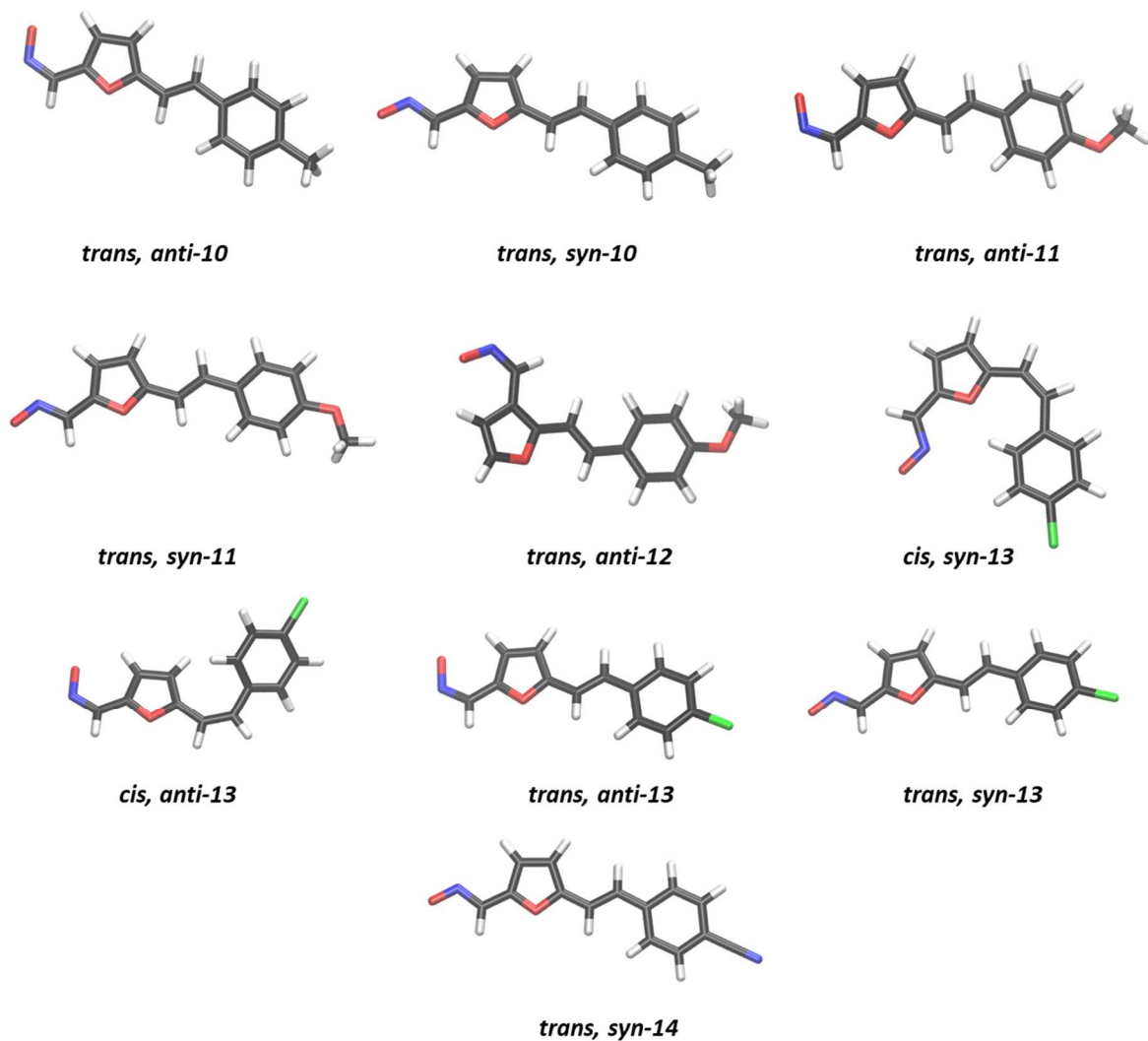
Slika 3.11. Prikaz dijela COSY spektra molekule *trans, syn-12*.

Uz ^1H i ^{13}C NMR spektre, za karakterizaciju sintetiziranih oksimskih derivata snimljeni su i dvodimenzijski spektri koji pokazuju korelaciju H-H (COSY). Slika 3.11. prikazuje COSY spektar na kojem se vide homonuklearna skalarna sprežanja (^1H - ^1H sprege), odnosno sprežanja protona kroz dvije ili tri veze, za spoj *trans, syn-12*. Vidljiva su sprežanja između protona C i D, protona E i F te protona C/H i H/G.

3.5. Računalno istraživanje

3.5.1. Istraživanje elektronske strukture novih oksimskih derivata

Stabilnost konformacija sintetiziranih furostilbena **10-14** ispitana je korištenjem metoda računalne kemije. Njihove optimirane strukture prikazane su na slici 3.12. Geometrije svih konformacija sa slike 3.xy optimirane su korištenjem Truhlarovog funkcionala M06-2X uz Popleov skup osnovnih funkcija 6-31G(d).



Slika 3.12. Prikaz najstabilnijih struktura sintetiziranih spojeva **10-14**, optimiranih na M06-2X/6-31G(d) razini teorije.

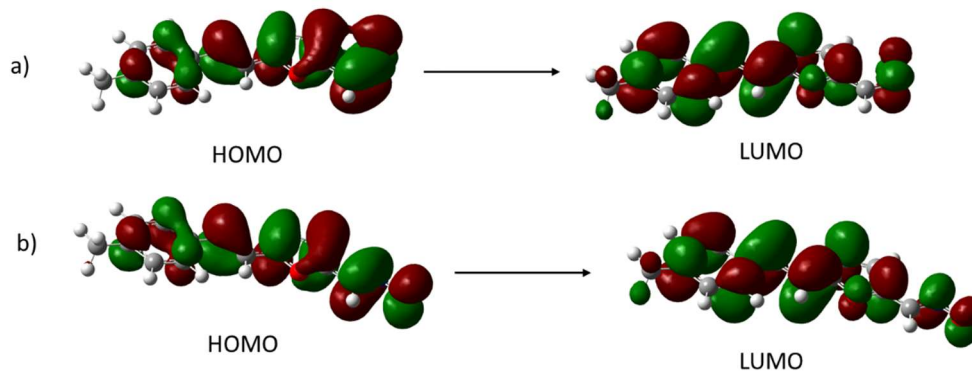
UV-Vis spektri spojeva **10-14** dobiveni su računski, korištenjem vremenski ovisne teorije funkcionala gustoće (engl. *Time-dependent Density Functional Theory*, TD-DFT). Taj pristup podrazumijeva računalno rješavanje vremenski ovisne perturbacijske jednadžbe, zasnovane na Runge-Gross teoremu⁶³,

koja je rješavana za 20 pobuđenih singletnih stanja za svaku molekulu u etanolu. Za opis otapala korištena je implicitna metoda koja koristi polarizabilni model kontinuuma. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 3.1.

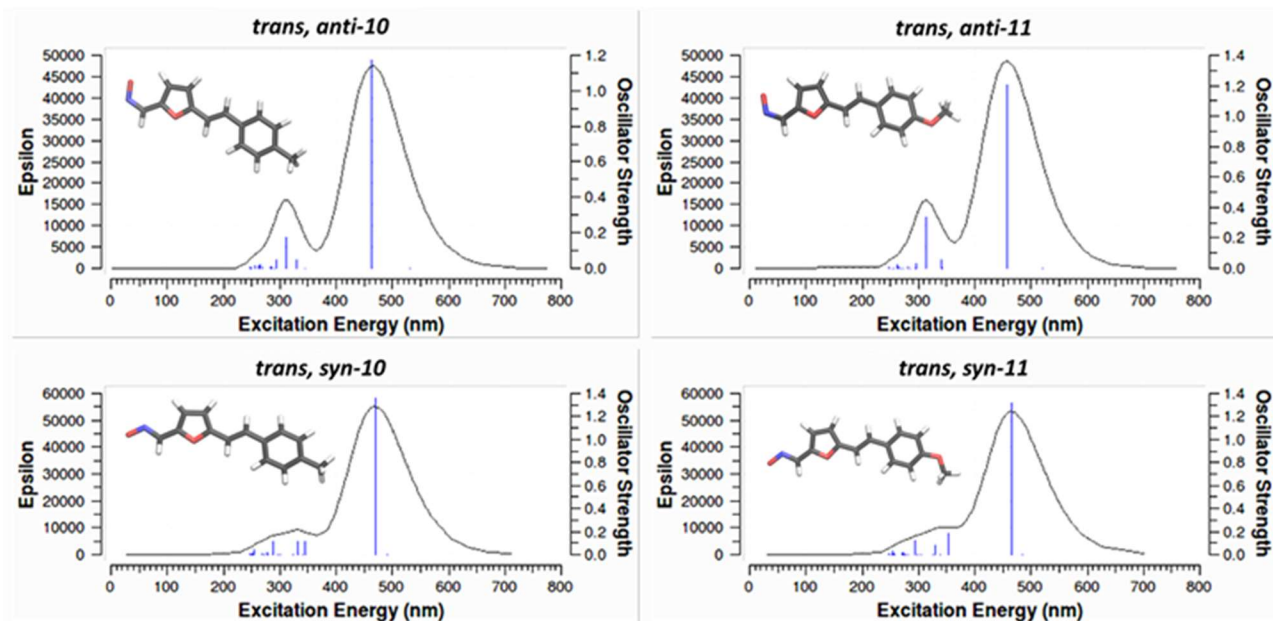
Tablica 3.1. Prikaz izračunatih maksimalnih valnih duljina, korištenjem etanola kao otapala, dobiven na razini teorije PBEhPBE/6-31++G(d).

MOLEKULA	$\lambda_{\max}^{\text{teor}}$ (nm)	ASIGNIRANI PRIJELAZI
<i>trans, anti-10</i>	464	H → L
<i>trans, syn-10</i>	469	H → L
<i>trans, anti-11</i>	457	H → L
<i>trans, syn-11</i>	466	H → L
<i>trans, anti-12</i>	453	H → L
<i>cis, anti-13</i>	476	H → L
<i>cis, syn-13</i>	476	H → L
<i>trans, anti-13</i>	483	H → L
<i>trans, syn-13</i>	486	H → L
<i>trans, syn-14</i>	535	H → L

Na slici 3.14. prikazani su UV-Vis spektri za molekule *trans, anti-10*, *trans, syn-10*, *trans, anti-11* i *trans, syn-11*. Vrijednosti λ_{\max} kreću se od 457 do 469 nm, a sve navedene apsorpcije odgovaraju HOMO → LUMO prijelazu. Navedeni prijelaz za molekulu **10** prikazan je na slici 3.13. Između izomera uočen je jednak trend, pa je tako λ_{\max} za *trans, anti*-izomere nešto manji od λ_{\max} *trans, syn*-izomera.

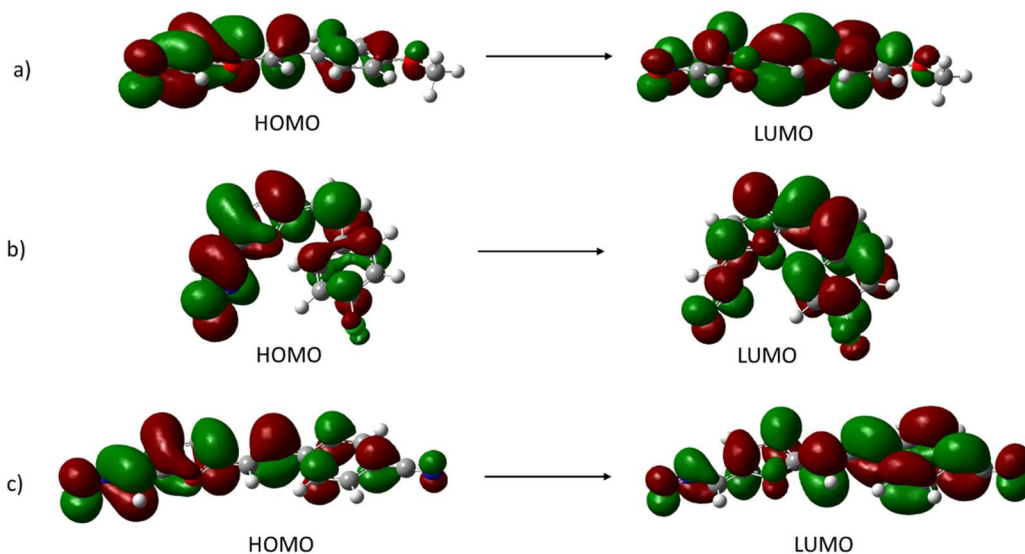


Slika 3.13. Prikaz HOMO i LUMO orbitala molekula *trans, anti-10* (a) i *trans, syn-10* (b), uključene u prijelaz zabilježen u UV-Vis spektru.



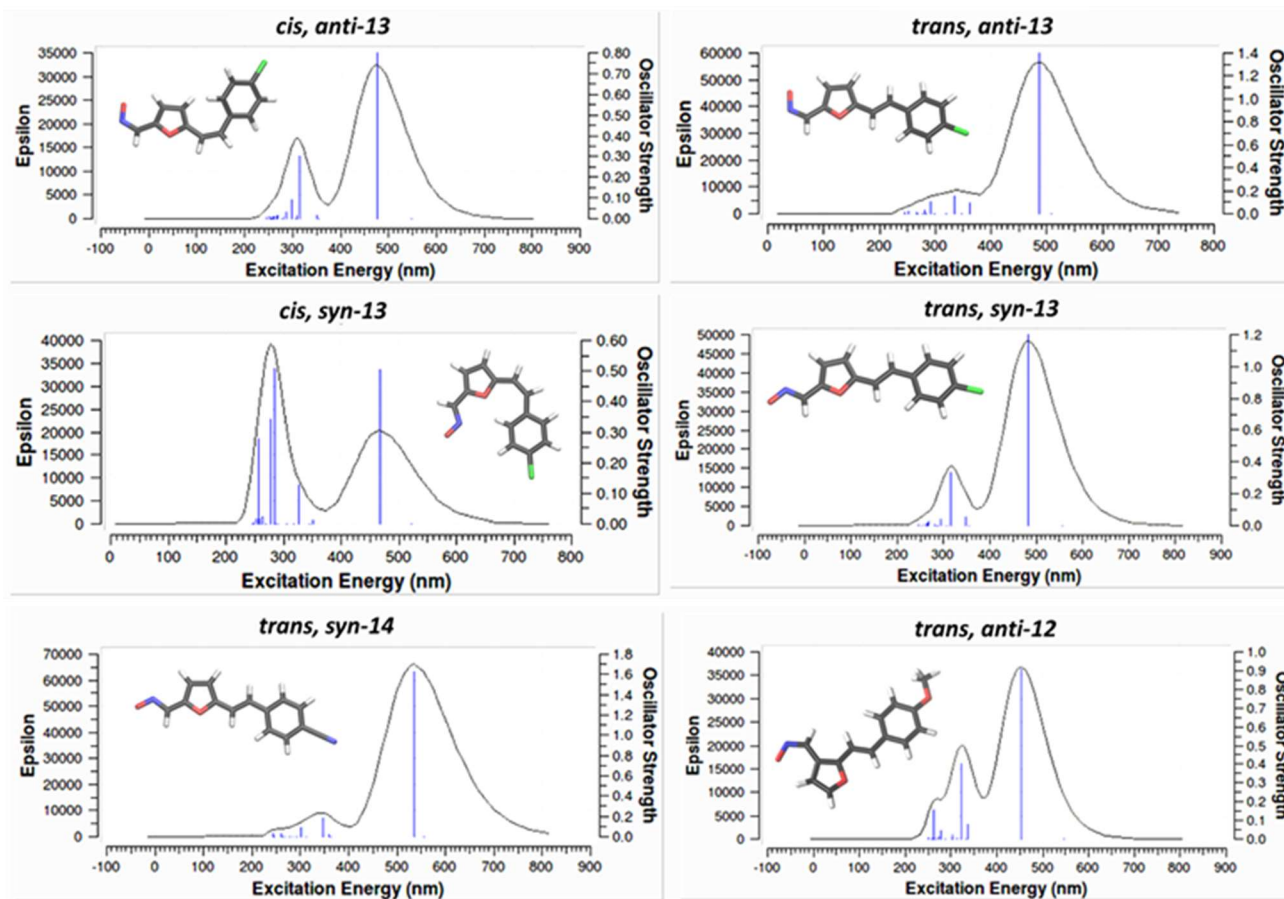
Slika 3.14. Grafički prikaz izračunatih UV-Vis spektara za molekule **10** i **11**, korištenjem etanola kao otapala.

Na slici 3.16. prikazani su ostali UV-Vis spektri dobiveni na razini teorije PBEhPBE/6-31++G(d). Kao što je vidljivo i iz tablice 3.1., svi apsorpcijski prijelazi odgovaraju HOMO \rightarrow LUMO prijelazu (slika 3.15.).



Slika 3.15. Prikaz HOMO i LUMO orbitala molekula **trans, syn-11** (a), **cis, syn-13** (b) i **trans, syn-14** (c), uključene u prijelaz zabilježen u UV-Vis spektru.

Najmanji λ_{\max} zabilježen je kod molekule **trans, anti-12** i iznosi 453 nm, dok je najveća vrijednost λ_{\max} uočena kod molekule **trans, syn-14** u iznosu od 535 nm. Kod **trans**-izomera molekule **13** vidljiv je već ranije spomenuti trend veće vrijednosti λ_{\max} za **syn**-derivat u odnosu na **anti**-, međutim kod derivata **cis, syn-13** i **cis, anti-13** vrijednost λ_{\max} jednaka je i iznosi 476 nm.

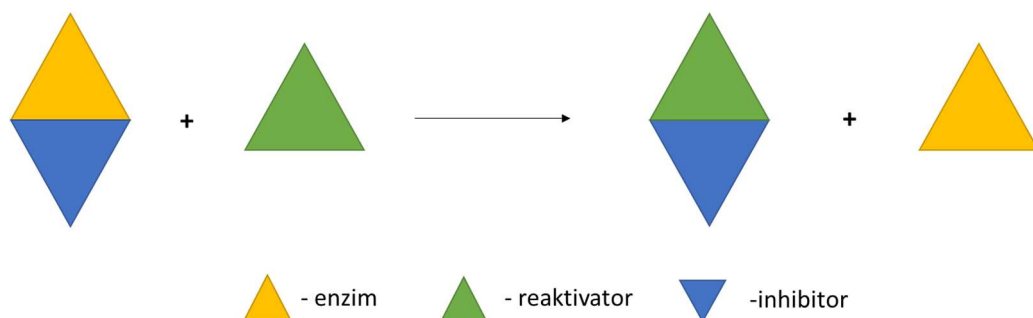


Slika 3.16. Grafički prikaz izračunatih UV-Vis spektara za molekule **12**, **13** i **14**, korištenjem etanola kao otapala.

3.5.2. Ispitivanje oksimskih derivata kao potencijalnih reaktivatora AChE i BChE

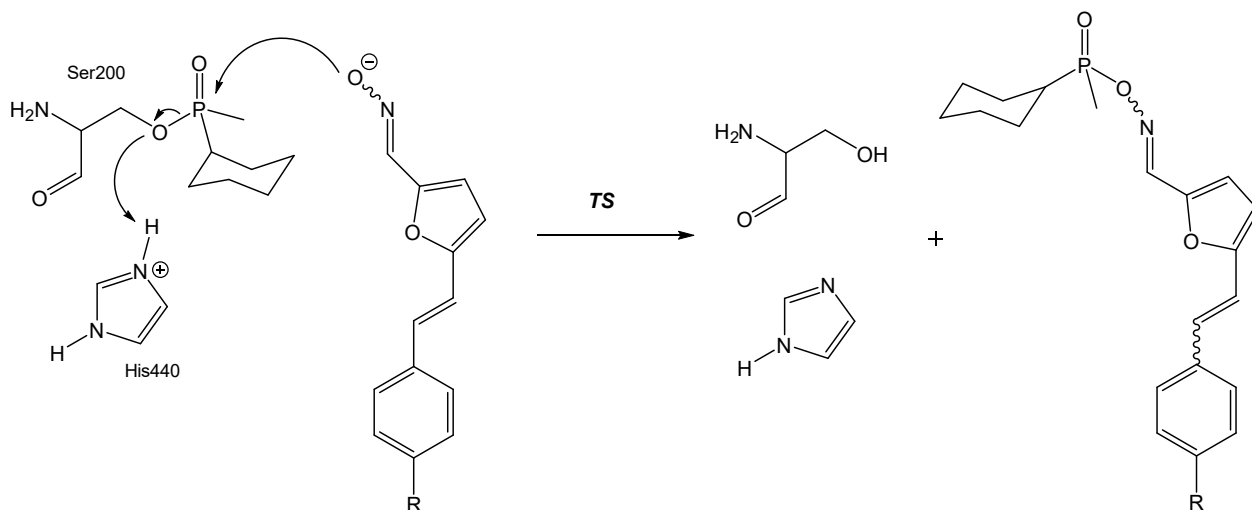
U ovom dijelu rada biti će prikazani rezultati računalnog ispitivanja mehanizma za reaktivaciju kolinesteraza, pri čemu su kao reaktivatori ispitivani sintetizirani oksimski derivati furostilbena.

Reaktivatori AChE i BChE su spojevi koji imaju sposobnost reagiranja s inhibitorom koji je kovalentno vezan u aktivno mjesto enzima. Reaktivatori na taj način mogu osloboditi aktivno mjesto čime je omogućena daljnja katalitička aktivnost enzima (slika 3.17.).



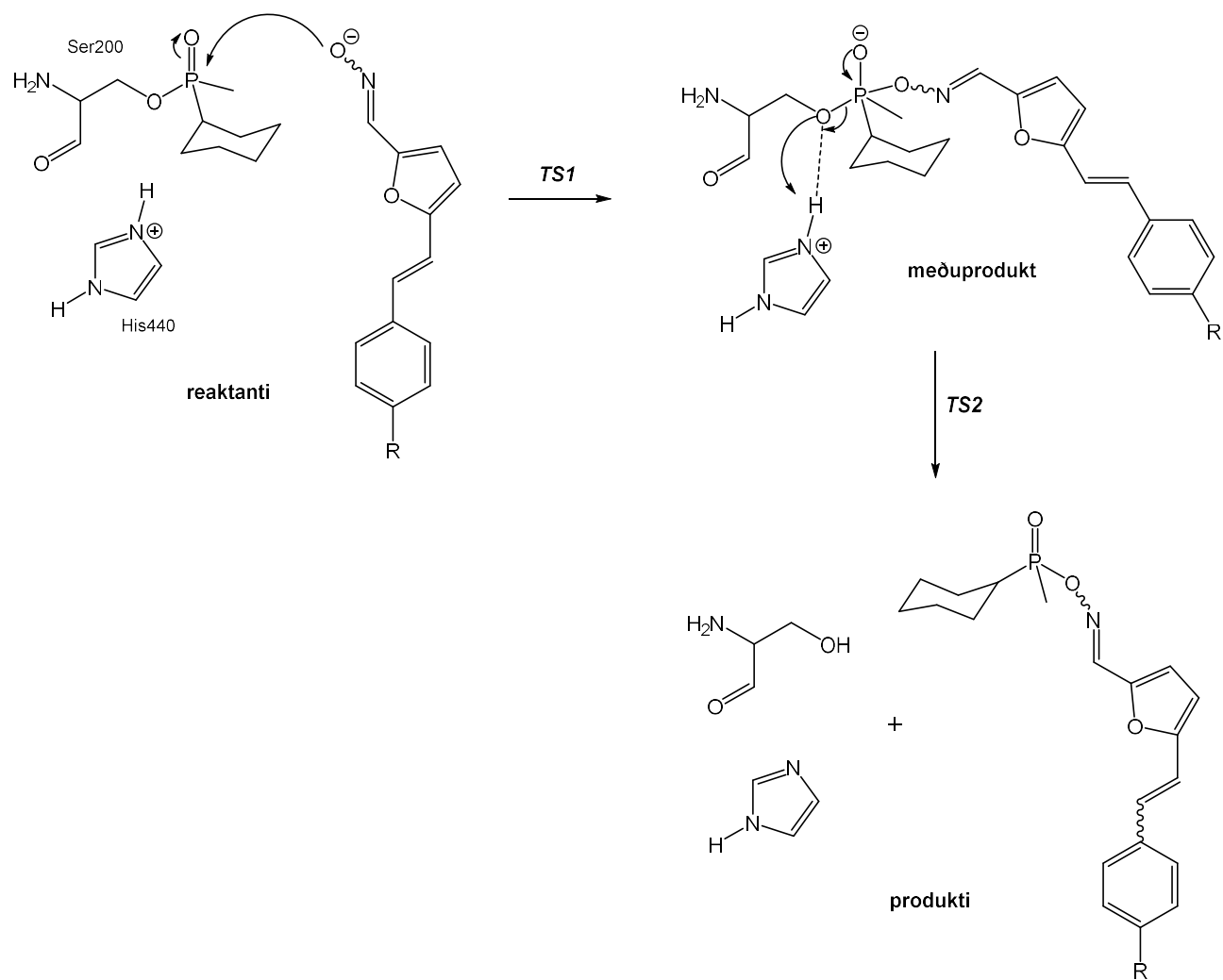
Slika 3.17. Shematski prikaz reakcije reaktivacije.

Za računalno modeliranje reakcije prikazane na slici 3.17. konstruiran je manji modeli sustav, u kojemu se nalaze ciklosarin kovalentno vezan za aminokiselinu Ser200 iz kolinesteraze, protonirani His440 i odabrani heterostilbenski oksim (shema 3.9.). Prvi stupanj reakcije je nukleofilni napad deprotoniranog oksimskog kisika na fosfor u ciklosarinu, koji je praćen pucanjem veze između fosfora i kisika na Ser200. Istovremeno se odvija i prijenos protona s His400 na kisik na Ser200.



Shema 3.9. Reaktivacija enzima inhibiranog ciklosarinom oksimskim furostilbenom (modelni sustav).

Reaktivacija kolinesteraze uključuje nastanak veze između oksima i fosfora te pucanje veze između fosfora i kisika koji pripada serinu. Na shemi 3.10., prikazan je pretpostavljeni mehanizam navedene reakcije na modelnom sustavu, koji uključuje dva koraka, nukleofilni napad oksimskog kisika na fosfor u ciklosarinu, pri čemu nastaje međuprodukt koji sadrži pentakoordinirani fosfor, te pucanje veze između serinskog kisika i fosfora, čime se enzim oslobađa inhibitora. To znači da je na plohi potencijalne energije (PES) moguće odrediti 5 stacionarnih točaka, tri minimuma i dva prijelazna stanja. Minimumi su reaktanti, međuprodukt s pentakoordiniranim fosforom i produkti, a prijelazna stanja su sedlaste točke prvoga reda koje povezuju minimume. Prvo prijelazno stanje TS1 povezuje reaktante s međuproduktom, a strukturom je veoma slično međuproduktu, dok se drugo prijelazno stanje (TS2) nalazi se na reakcijskom putu između međuprodukta i produkta.



Shema 3.10. Mehanizam reaktivacije u dva stupnja.

Međutim, moguće je da se navedeni procesi, poput nastanka jedne i pucanja druge veze, događaju istodobno. Tada se ne može locirati međuprodukt kao minimum na PES, nego se cijela reakcija odvija u jednom koraku, tj. preko jednog prijelaznog stanja (shema 3.9).

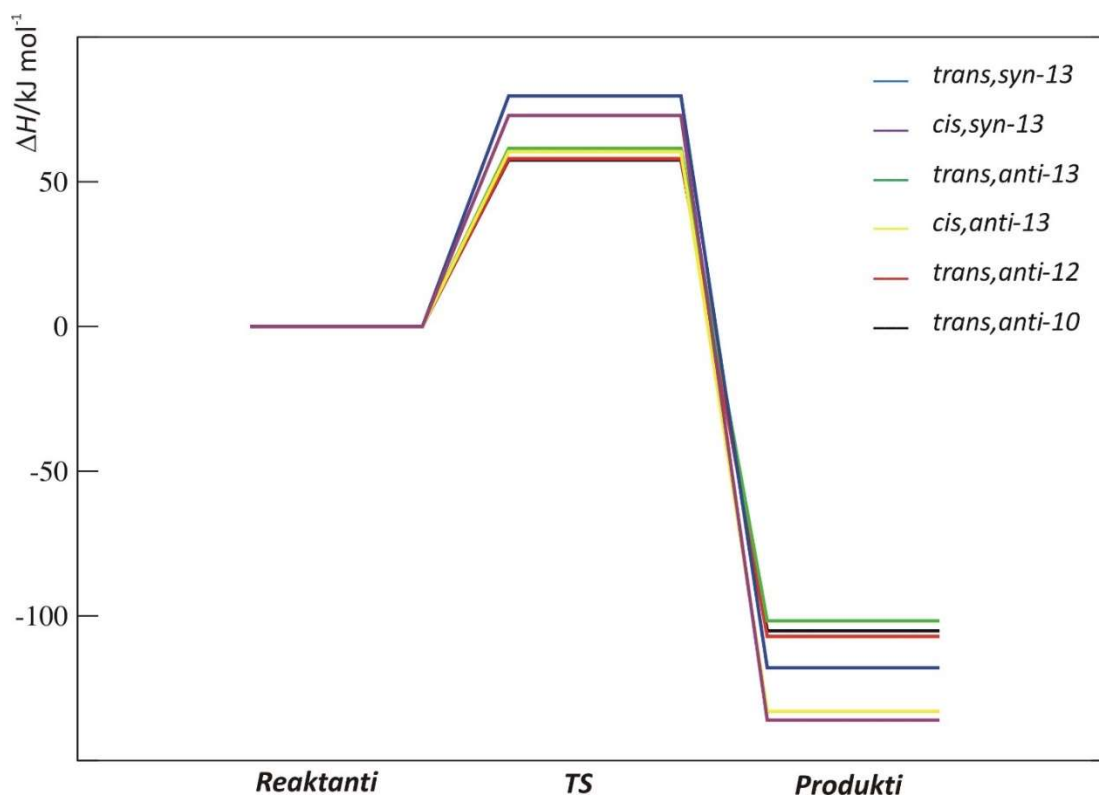
Reakcija reaktivacije modelirana je za 6 oksimskih derivata: **trans, anti-10, trans, anti-12, trans, anti-13, trans, syn-13, cis, anti-13** i **cis, syn-13** (slika 3.11.). Korištenjem razine teorije M062X/6-31G(d) optimirane su geometrije početnog kompleksa (*reaktanti*) za svaki od ispitivanih oksima. Zatim je napravljeno skeniranje PES u smjeru nastanka međuprodukta, tako što je oksimski kisik približavan fosforu u inkrementima od 0,1 Å. Za svaki od položaja atoma kisika napravljena je djelomična optimizacija strukture kojoj odgovara neka vrijednost energije sustava. Primicanjem kisika fosforu, na nekoj kritičnoj udaljenosti energija će dosegnuti maksimalnu vrijednost, nakon čega će daljnjim primicanjem kisika početi padati. Struktura koja ima maksimalnu energiju najbliža je prijelaznom stanju i nju treba uzeti kao polaznu za potpunu optimizaciju geometrije prijelaznog stanja. Nakon pune optimizacije geometrije, vibracijskom analizom provjeri se radi li se o prijelaznom stanju: TS mora imati jednu imaginarnu vibraciju, tj. vibraciju s negativnom vrijednošću valnog broja, pri čemu vizualno ta vibracija treba odgovarati očekivanoj promjeni geometrije na reakcijskom putu. U slučaju TS₁, imaginarna vibracija izgledat će kao istezanje veze koja tek treba nastati, između oksimskog kisika i fosfora. Također, stacionarne točke koje odgovaraju minimumima ne smiju imati nijednu imaginarnu vibraciju.

Lociranjem stacionarnih točaka na PES za ovu reakciju, dobije se energijski profil iz kojeg se može procijeniti je li ona kinetički ostvariva i odvija li se spontano. Naime, razlika u energiji između reaktanta i TS₁ ("reakcijska barijera") određuje brzinu tog koraka reakcije, a razlika energija između reaktanata i produkata pokazuje je li reakcija endo- ili egzotermna. Izračunatoj vrijednosti energije za pojedinu stacionarnu točku potrebno je dodati energiju vibracija na 0 K (eng. *Zero Point Vibrational Energy, ZPVE*), čime se dobije vrijednost entalpije na 0 K. Za entalpiju koja odgovara temperaturi od 298 K, potrebno je ukupnoj energiji dodati termalnu korekciju na entalpiju, što se također izvodi iz ZPVE.

Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 3.2. i na slici 3.18. Kod svih ispitivanih sustava, reaktivacija se odvila u jednom koraku, a minimum na PES koji bi odgovarao međuproduktu koji sadrži pentakoordinirani fosfor nije lociran. Prijelazno stanje za svaki sustav imalo je po jednu imaginarnu vibraciju koja je odgovarala očekivanom primicanju oksimskog kisika fosforu.

Tablica 3.2. Vrijednosti promjene entalpije za reakciju reaktivacije, izračunate na M062X/6-31G(d) razini teorije, za neke od sintetiziranih oksimskih heterostilbena (u kJ mol⁻¹).

Oksimski derivat	Reaktanti	TS	Produkti
<i>trans, anti-10</i>	0,0	57,5	-105,1
<i>trans, anti-12</i>	0,0	58,0	-107,1
<i>trans, anti-13</i>	0,0	61,5	-101,7
<i>trans, syn-13</i>	0,0	79,6	-111,6
<i>cis, anti-13</i>	0,0	60,4	-133,0
<i>cis, syn-13</i>	0,0	72,9	-136,0



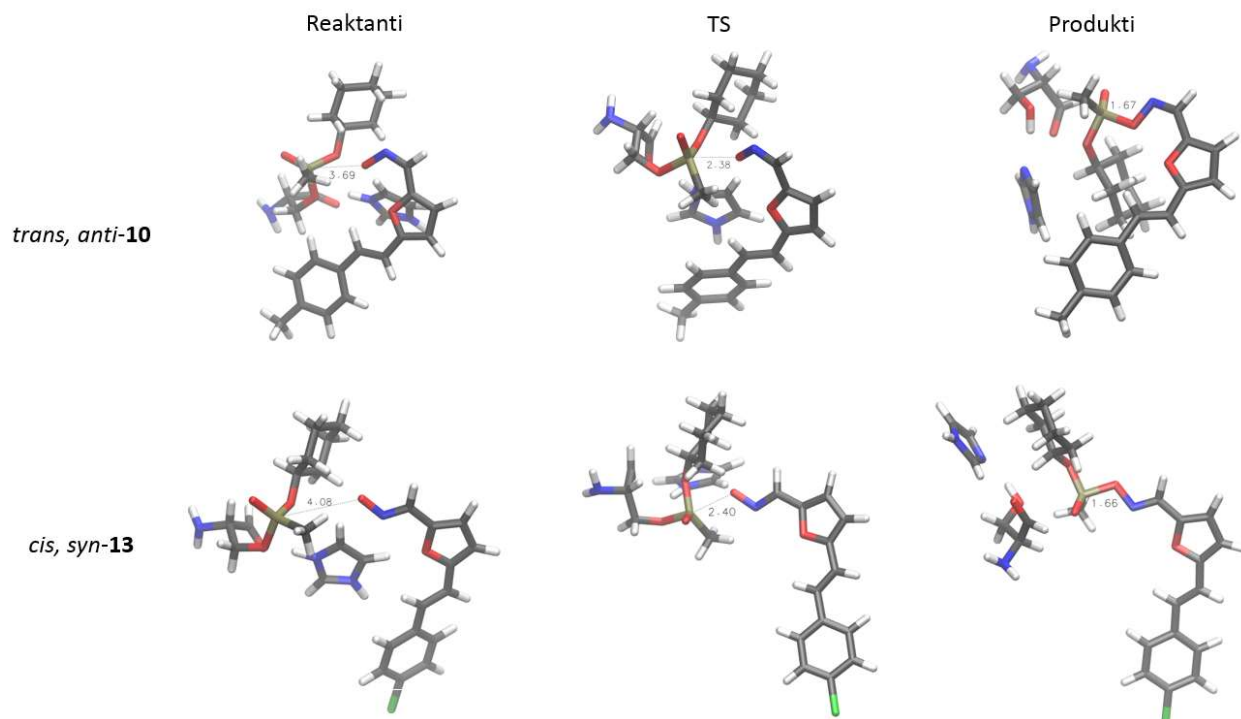
Slika 3.18. Energijski profil reakcije reaktivacije za različite oksimske derivate (tablica 3.2)

Iz podataka prikazanih u tablici 3.2 i na slici 3.18 vidi se da je reakcijska barijera reaktivacije za sve ispitivane spojeve kod kojih oksimska skupina ima *anti*-orijentaciju vrlo slična (oko 60 kJ mol⁻¹), dok *trans-cis* izomerija nije imala utjecaja na visinu barijere, kao ni različiti supstituenti na fenilu (metil, metoksi i klor). Kod oba ispitivana derivata kod kojih oksimska skupina zauzima *syn*-orijentaciju, barijera je primjetno viša (79,6 kJ mol⁻¹ i 72,9 kJ mol⁻¹ za ***trans, syn-13*** i ***cis, syn-13***). Ove vrijednosti reakcijske barijere još uvijek su dovoljno niske da se reaktivacija odvija spontano, ali može se zaključiti da će reakcija ići brže kada se u ulozu reaktivatora nalazi spoj s oksimskom skupinom *anti*-orijentacije. Barijera za reaktivaciju uz *syn*-oksime nešto je viša zbog razlika u strukturama prijelaznog stanja i reaktanata između *syn*- i *anti*-oksima. Promjena reaktanta koja vodi ka produktu reaktivacije uključuje skraćivanje udaljenosti između oksimskog kisika (O_{oks}) i ciklosarinog fosfora u kompleksu (P). Pregledom optimiranih geometrija reaktanta i TS u svim ispitivanim sustavima, vidi se da su udaljenosti $d(O_{oks}-P)$ u reaktantima i u prijelaznim strukturama slične (od 3,69 do 4,08 Å za reaktante i od 2,30 do 2,39 Å za TS, tablica 3.4). Međutim, primjetno je da je put koji prijeđu atom kisika i fosfora uzajamno se primičući (tj. razlika u udaljenostima d) kod *syn*-orijentiranih oksima nešto dulji, što utječe i na razliku u energijama, tj. na visinu barijere.

Tablica 3.4. Udaljenosti između kisika na oksimu i atoma fosfora u kompleksu, u reaktantima i prijelaznim strukturama (u Å). Δd označava smanjenje udaljenosti između kisika na oksimu i fosfora, od reaktanta do prijelaznog stanja, $\Delta d = d(O_{oks}-P)_{\text{reakt}} - d(O_{oks}-P)_{\text{TS}}$.

Oksimski derivat	$d(O_{oks}-P)$		Δd
	Reaktanti	TS	
<i>trans, anti-10</i>	3,69	2,38	1,31
<i>trans, anti-12</i>	3,74	2,32	1,42
<i>trans, anti-13</i>	3,69	2,38	1,31
<i>trans, syn-13</i>	4,08	2,40	1,68
<i>cis, anti-13</i>	3,71	2,30	1,41
<i>cis, syn-13</i>	3,79	2,33	1,46

Strukture optimiranih geometrija reaktanta, prijelaznog stanja i produkta za sustave u kojima se nalaze oksimski derivati **trans, anti-10** i **trans, syn-13** prikazane su na slici 3.19.

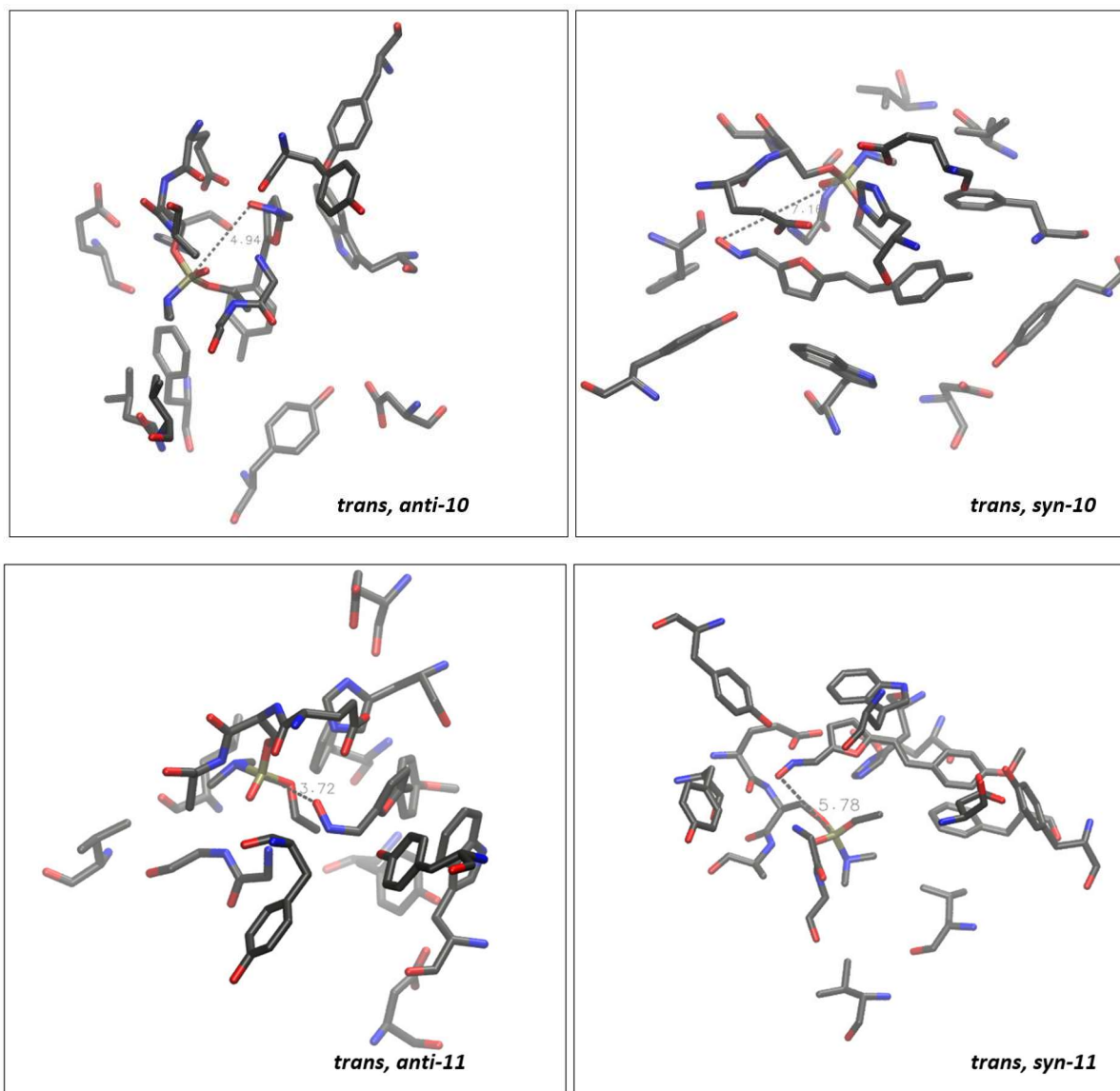


Slika 3.19. Optimirane strukture reaktanta, prijelaznog stanja i produkta za reaktivaciju uz oksime **trans, anti-10** i **trans, syn-13**.

Kao što je već spomenuto, svi DFT računi za mehanizam reaktivacije napravljeni su za manji modelni sustav i u plinskoj fazi, bez uzimanja u obzir proteinskog okoliša kakav je stvarno prisutan u enzimu. Dodatnim računanjem energije na optimiranom modelnom sustavu koji sadrži molekulu **trans, anti-10** uz korištenje modela implicitnog otapala (pri čemu je odabrana dielektrična konstanta $\epsilon = 4$, jer odgovara vrijednosti ϵ u enzimu), ispostavilo se da se energijske barijere i termodinamičke ravnoteže ne mijenjaju u odnosu na one dobivene u plinskoj fazi. Međutim, glavna mana malog modela koji je korišten za ispitivanje mehanizma reaktivacije je izostavljanje nekih dodatnih aminokiselina koje se nalaze u aktivnom mjestu enzima. Da bi se dobile približne strukture cijelog aktivnog mjesta kolinesteraza inhibiranih nekim od poznatih inhibitora u kompleksu s oksimskim derivatima furostilbena kao potencijalnim reaktivatorima, napravljen je molekulski *docking*.

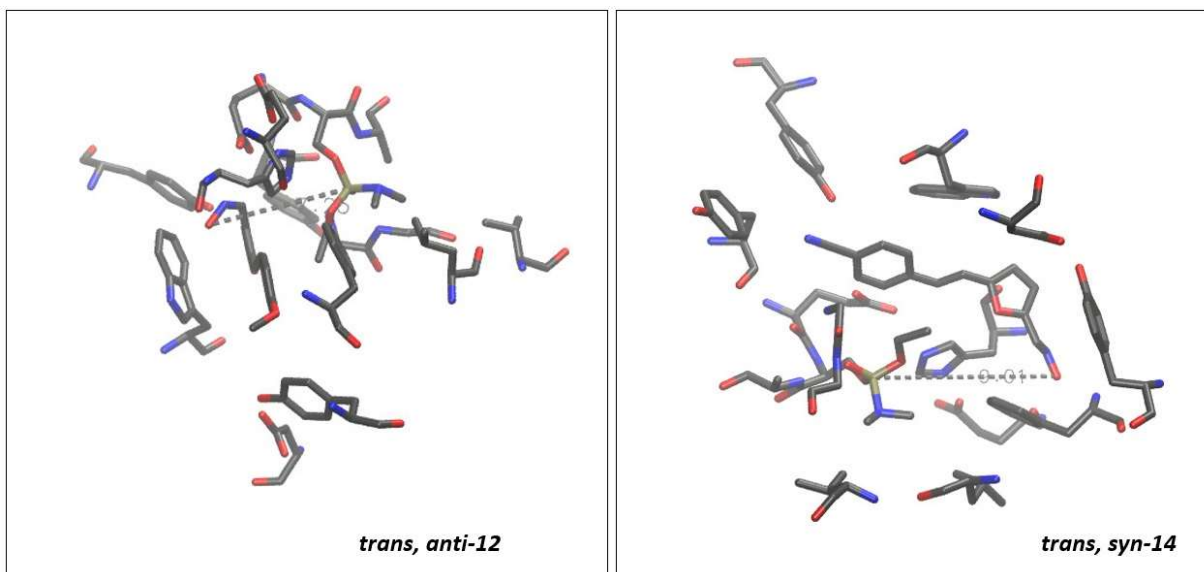
Korištenjem programa Autodock⁶⁴ modeliran je docking svakog od oksimskih derivata furostilbena sintetiziranih u ovom radu (slika 3.12) u aktivno mjesto butiril kolinesteraze u kojemu je vezan inhibitor

tabun. Aktivno mjesto butirilkolinesteraze u kompleksu s tabunom preuzeto je iz kristalne strukture 3DJY.pdb,⁶⁵ i osim tabuna, sadrži još 15 aminokiselina: Asp70, Trp82, Tyr114, Gly116, Gly117, Tyr128, Glu197, Ser198, Ala199, Leu286, Val288, Glu325 Phe329, Tyr332 i His438. Inhibitor tabun je kovalentno vezan za Ser198. Dockingom svake ispitivane molekule-potencijalnog reaktivatora dobiveno je po 10 struktura u kojima se potencijalni reaktivator smjestio unutar aktivnog mjesta inhibiranog enzima. Za svaku od struktura izmjerena je udaljenost oksimskog kisika od atoma fosfora u tabunu te su kao najpovoljnije izdvojene one u kojima je postignuta najmanja udaljenost. Strukture kompleksa dobivenih dockingom prikazane su na slikama 3.20, 3.21 i 3.22.



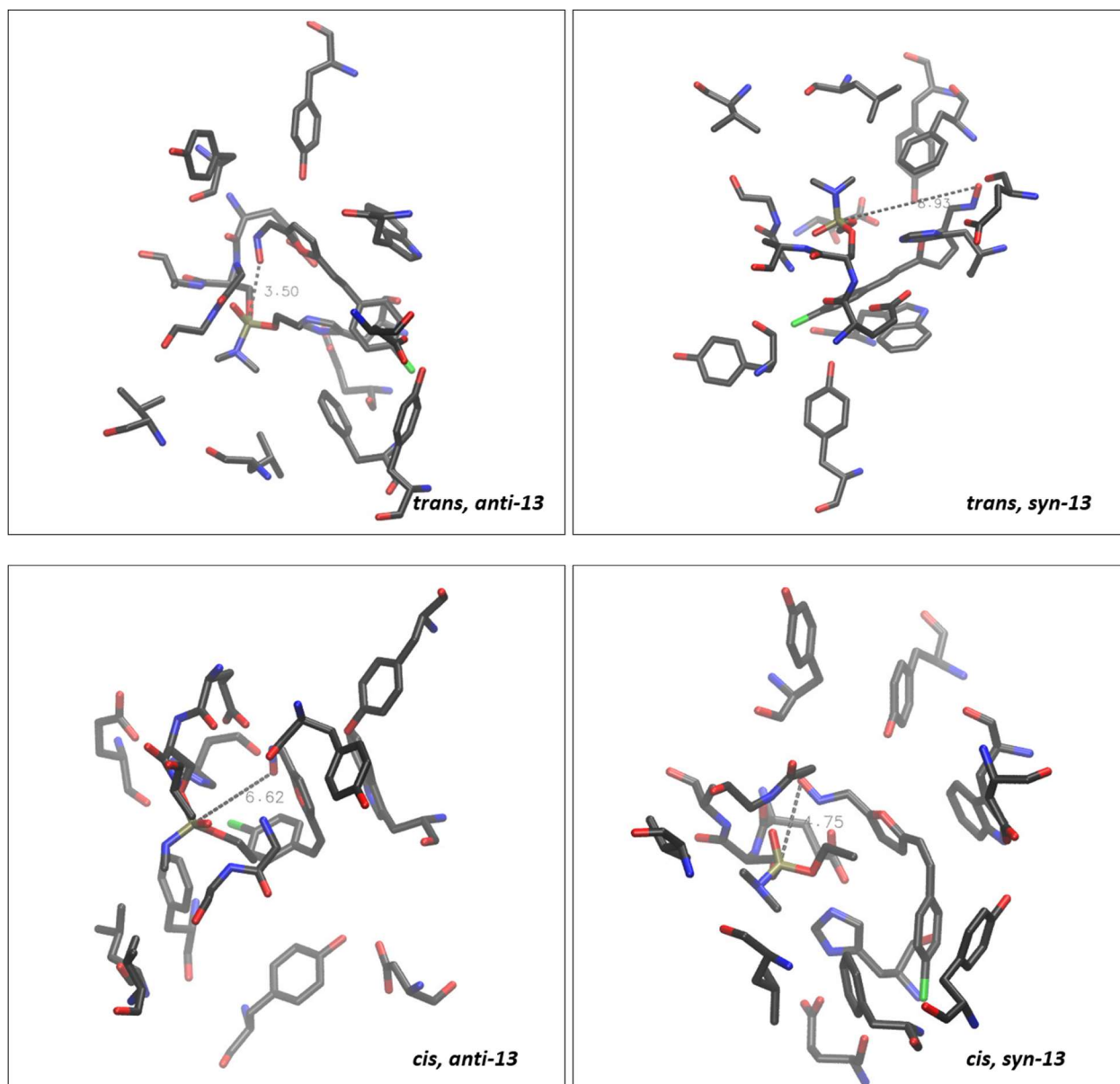
Slika 3.20. Strukture kompleksa koji nastaje smještanjem (dockingom) spojeva **10** i **11** u aktivno mjesto butirilkolinesteraze inhibirane tabunom. Atomi vodika izostavljeni su radi preglednosti.

Kod spojeva **10** i **11** (s metilnim, odnosno metoksi-supstituiranim fenilom), *anti*-orijentacija oksimske skupine rezultira povoljnijim položajem potencijalnog reaktivatora, u usporedbi sa *syn*-izomerom, sudeći po udaljenosti oksimskog kisika od atoma fosfora u tabunu. Taj rezultat je u skladu s rezultatima ispitivanja mehanizma reaktivacije. Za molekulu **trans, anti-12** najmanja udaljenost između oksimskog kisika i fosfora u tabunu iznosi 7,25 Å, dok je kod spoja **trans, syn-14** analogna udaljenost čak 9,01 Å (slika 3.21).



Slika 3.21. Strukture kompleksa koji nastaje smještanjem (dockingom) spojeva **12** i **14** u aktivno mjesto butirilkinesteraze inhibirane tabunom.

Na kraju, kod spoja **13** gdje postoje sva četiri izomera (*trans, anti*; *trans, syn*; *cis, anti* i *cis, syn*), kod *trans*-izomera, *anti*-orijentacija oksima rezultira povoljnijim smještanjem u inhibirano aktivno mjesto, s udaljenostima od 3,50 i 6,93 Å za *anti* i *syn*-oksim. Međutim, kod *cis*-izomera, situacija je obrnuta: *anti*-orijentacija dockingom daje strukturu kod koje je udaljenost između oksimskog kisika i fosfora 6,62 Å, a *syn*-izomer rezultira najpovoljnijom strukturom kod koje je udaljenost 4,74 Å (slika 3.22).



Slika 3.22. Strukture kompleksa koji nastaje smještanjem (dockingom) spoja **13** u aktivno mjesto butirilkinesteraze inhibirane tabunom.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

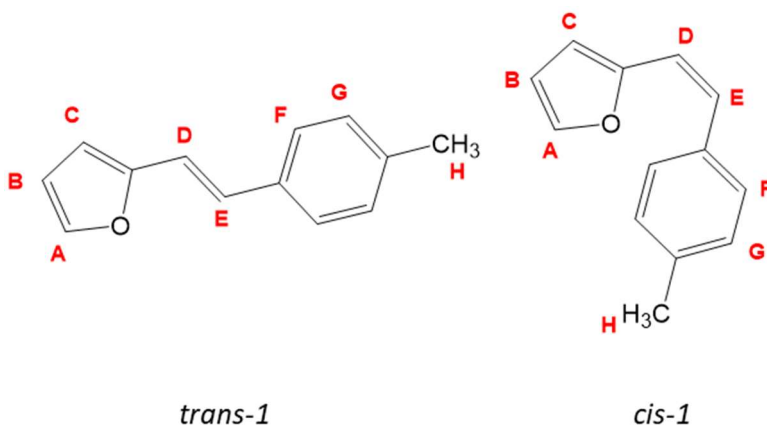
Kromatografska odjeljivanja provedena su na kolonama punjenim silikagelom (Fulka 0.063-0.2 nm i Fluka 60 Å, tehnički) i na pločama presvučenim tankim slojem silikagela (0.2 mm, 60 F₂₅₄, Merck). Kao sredstvo za sušenje organskih spojeva koristio se bezvodni MgSO₄, a otapala su uparena pomoću rotacijskog uparivača pod sniženim tlakom.

Za identifikaciju organskih spojeva korištena je nuklearna magnetna rezonancija (NMR tehnika, ¹H i ¹³C NMR). ¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker AV-600 koji radi na frekvenciji od 600 MHz za ¹H jezgre i frekvenciji od 150 MHz za ¹³C jezgre, na Institutu Ruđer Bošković. Svi NMR spektri snimani su u CDCl₃ kao otapalu, koristeći TMS kao unutarnji standard. Za asignaciju signala korištene su i dodatne tehnike, poput 2D-CH korelacija (HSQC) i 2D HH-COSY. Korištene su kratice s - singlet, d - dublet, t - triplet, AB_q – AB-kvartet, q- kvartet, m – multiplet, PE - petroleter, DCM – diklormetan, E - dietil-eter, C_{KV} – kvaterni ugljikov atom, C_{Ar} – aromatski ugljikov atom i H_{Ar} – aromatski vodikov atom.

Početne fosfonijeve soli priređene su u laboratoriju, dok su ostali korišteni spojevi kupovne kemikalije.

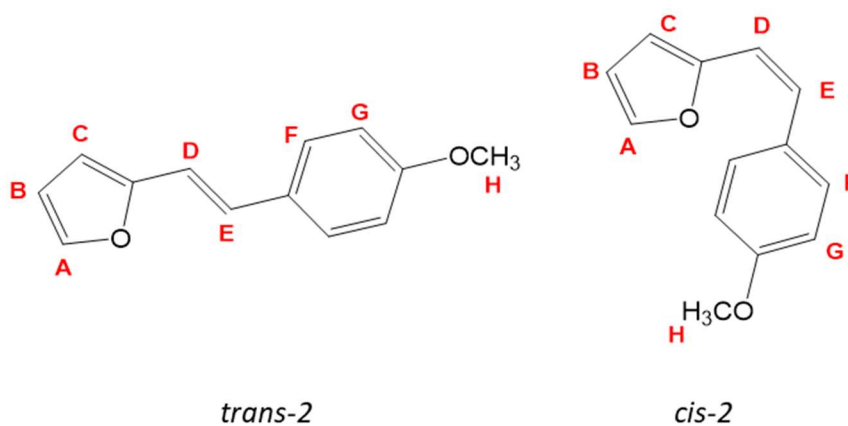
4.2. Sinteza furostilbena **1-4**

Furostilbeni **1-3** pripravlja se Wittigovom reakcijom. Aparatura, koja se sastoji od trogrle tikvice, lijevka za dokapavanje i klor-kalcijske cijevi, prije početka reakcije propuhuje se dušikom 10 minuta. U trogrlu tikvicu ulije se 100 mL EtOH (sušen na 4 Å sitima) u kojem se potom otopi odgovarajuća fosfonijeva sol (5 mmol). Nakon otapanja soli, u tikvicu se dodaje 5 mmol aldehida te se u atmosferi dušika smjesa miješa na magnetnoj miješalici, pri sobnoj temperaturi. U lijevku za dokapavanje ulije se 10 ml suhog EtOH, u kojem je potrebno otopiti 5.5 mmol elementarnog natrija (1.1 eq). Nakon što se Na otopi, dobiveni NaOEt dokapava se u tikvicu, prilikom čega je vidljiva blaga promjena boje smjese iz žute u narančastu. Tako pripremljena smjesa miješa se preko noći na sobnoj temperaturi. Smjesa *cis*- i *trans*-furostilbena **4** također je pripremljena Wittigovom reakcijom, uz korištenje furanske soli i 4-cijanobenzaldehida. U trogrlu tikvicu ulije se 150 mL EtOH, a potom se doda 11 mmol furanske soli i 10 mmol 4-cijanobenzaldehida. U lijevku za dokapavanje napravi se otopina NaOEt (10 mmol Na u 10 mL EtOH), koja se potom lagano dolijeva u trogrlu tikvicu. Reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 20 sati. Završetak reakcije provjerava se pomoću tankoslojne kromatografije. Otapalo se uparava na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom, nakon čega slijedi ekstrakcija. Ona se provodi u sustavu toluen/voda te se nakon ekstrakcije organski sloj suši na MgSO₄ 30 minuta. Suha reakcijska smjesa, dobivena nakon sušenja, filtracije i uparavanja toluena, pročišćava se kolonskom kromatografijom na silikagelu korištenjem eluensa PE/E promjenjive polarnosti. Kao produkti Wittigove reakcije nastaju smjese *cis*- i *trans*- izomer furostilbena **1-3**, koji su korišteni kao reaktanti u reakcijama sinteze aldehida **5-8**.



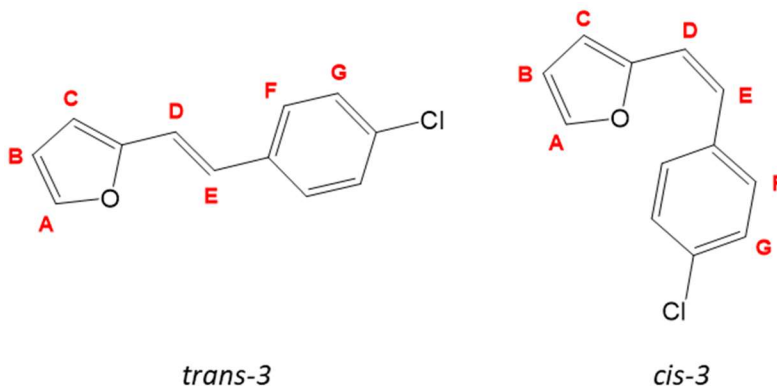
***trans-2*-(4-metilstiril)furan (*trans-1*)** : 475 mg (izoliran, 51.91%); R_f (PE) = 0.36; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7.38 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H_A), 7.35 (d, 2H, $J = 8$ Hz, $\text{H}_{G/H}$), 7.13 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, $\text{H}_{G/H}$), 7.00 (d, 1H, $J = 16$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.84 (d, 1H, $J = 16$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.39 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, 3.3 Hz, H_B), 6.25 (d, 1H, $J = 3.3$ Hz, H_C), 2.33 (s, 3H, H_H).

***cis-2*-(4-metilstiril)furan (*cis-1*)**: 317 mg (izoliran, 34.39%); R_f (PE) = 0.36; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7.37 (d, 2H, $J = 8$ Hz, $\text{H}_{G/H}$), 7.29 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, H_H), 7.12 (d, 2H, $J = 8$ Hz, $\text{H}_{G/H}$), 6.43 (d, 1H, $J = 12$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.32 (d, 1H, $J = 12$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.31 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, H_C), 6.30 (dd, 1H, $J = 2.8$ Hz, 1.5 Hz, H_B), 2.35 (s, 3H, H_H).



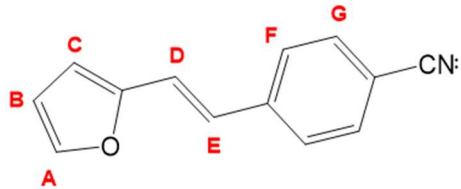
***trans-2*-(4-metoksistiril)furan (*trans-2*)**: 750 mg (izoliran, 36.05%); R_f (PE:E=100:2) = 0.31; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7.51 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, H_A), 7.40 (dd, 1H, $J = 1.4$ Hz, 2.5 Hz, H_B), 7.38 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{G/F}$), 6.88 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{G/F}$), 6.83 (d, 1H, $J = 16$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.77 (d, 1H, $J = 16$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.64 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, H_C), 3.82 (d, 3H, H_H).

***cis*-2-(4-metoksistiril)furan (*cis*-2):** 310 mg (izoliran, 14.90%); R_f (PE:E=100:2) = 0.32; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7.39 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $\text{H}_{\text{G/F}}$), 7.28 (d, 1H, $J = 1.3$ Hz, H_A), 7.06 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.85 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $\text{H}_{\text{G/F}}$), 6.78 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.30 (dd, 1H, $J = 1.3$ Hz, 3.1 Hz, H_B), 6.25 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz, H_C), 3.78 (s, 3H, H_H).

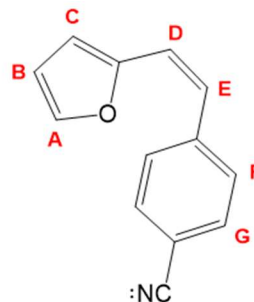


***trans*-2-(4-klorostiril)furan (*trans*-3):** 272 mg (izoliran, 25.54%); R_f (PE:E=100:2) = 0.94; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7.39 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, H_A), 7.32 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{G/F}}$), 7.28 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{G/F}}$), 6.97 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.84 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.35 (d, 1H, $J = 3.3$ Hz, H_C), 6.32 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz, 3.3 Hz, H_B).

***cis*-2-(4-klorostiril)furan (*cis*-3):** 240 mg (izoliran, 22.57%); R_f (PE:E=100:2) = 0.95; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7.38 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{G/F}}$), 7.30 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H_A), 7.29 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{G/F}}$), 6.40 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.35 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.35-6.32 (m, 1H, H_B), 6.26 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, H_C).



trans-4



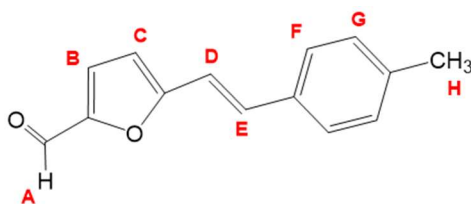
cis-4

***trans-4*-(2-(furan-2-yl)vinyl)benzonitril (*trans-4*)**: 150 mg (izoliran, 7.69%); R_f (PE:E=10:3) = 0.22; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7.54 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $H_{G/F}$), 7.51 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $H_{G/F}$), 7.44 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, H_A), 7.01 (d, 1H, $J = 16.3$ Hz, $H_{D/E}$), 6.97 (d, 1H, $J = 16.3$ Hz, $H_{D/E}$), 6.45 (d, 1H, $J = 3.3$ Hz, H_C), 6.36 (dd, 1H, $J = 1.9$ Hz, 3.3 Hz, H_B).

***cis-4*-(2-(furan-2-yl)vinyl)benzonitril (*cis-4*)**: 170 mg (izoliran, 8.71%); R_f (PE:E=10.3) = 0.19; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7.55 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $H_{G/F}$), 7.50 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, $H_{G/F}$), 7.30 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, H_A), 6.44 (d, 1H, $J = 12.4$ Hz, $H_{D/E}$), 6.40 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz, $H_{D/E}$), 6.37-6.35 (m, 1H, H_B), 6.31 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz, H_C).

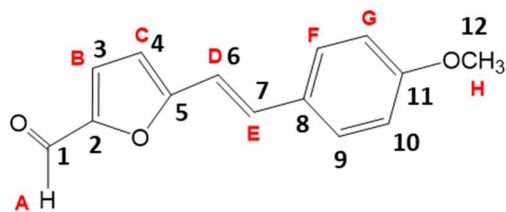
4.3. Sinteza aldehida 5-9

Furostilbeni **1-4**, dobiveni Wittigovom reakcijom, podvrgnuti su Vilsmeier-Haackovom formiliranju, u svrhu dobivanja aldehida **5-9**. U tikvicu od 25 ml ulije se 1 ml DMF-a (3 eq) u kojem je potrebno otopiti odgovarajući furostilben (1 mmol). Cijela se tikvica stavi u ledenu kupelj i smjesa se miješa 10 minuta na temperaturi do 10°C. Potom se u tikvicu lagano dokapava 1 mmol POCl₃. Nakon 20 minuta ledena kupelj se uklanja, a smjesa se nastavlja miješati na sobnoj temperaturi. Kod sinteze aldehida **5** i **7** nakon 20 minuta smjesa se zagrijavala na 85°C, dok se kod ostalih aldehida smjesa ostavila na miješalici 48 sati, bez zagrijavanja. Po završetku reakcije, reakcijske smjese je potrebno neutralizirati korištenjem 10%-tne otopine NaOH. pH vrijednost provjerava se pomoću lakmus papira, a otopina NaOH dokapava se sve dok papir ne poprimi plavu boju. Nakon neutralizacije, slijedi ekstrakcija s dietil-eterom i vodom. Smjesa se prvo ekstrahira dietil-eterom, a potom se organski sloj dodatno ispiri vodom. Sušenje organskog sloja provodi se pomoću MgSO₄, 30 minuta. Suha reakcijska smjesa pročišćava se kolonskom kromatografijom na silikagelu korištenjem eluensa PE/E promjenjiva omjera. Dodatna pročišćavanja provedena su pomoću preparativne tankoslojne kromatografije, a kao sredstvo za razvijanje korištena je smjesa otapala PE/E promjenjive polarnosti. Kao produkti Vilsmeier-Haackovog formiliranja nastaju smjese *cis*- i *trans*- izomera u slučaju aldehida **6**, **8** i **9**, te čisti *trans*- izomeri aldehida **5** i **7**.

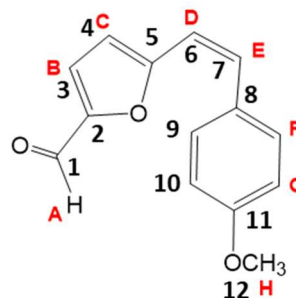


trans-5

***trans*-5-(4-metilstiril)furan-2-karbaldehid (*trans*-5)**: 693 mg (izoliran, 76.0%); R_f (PE:E=100:2) = 0.15; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 9.58 (s, 1H, H_A), 7.40 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H_{F/G}), 7.36 (d, 1H, J = 16 Hz, H_{D/E}), 7.24 (d, 1H, J = 3.8 Hz, H_{B/C}), 7.18 (d, 2H, J = 7.7 Hz, H_{F/G}), 6.88 (d, 1H, J = 16.5 Hz, H_{D/E}), 6.50 (d, 1H, J = 3.8 Hz, H_{B/C}), 2.36 (s, 3H, H_H).



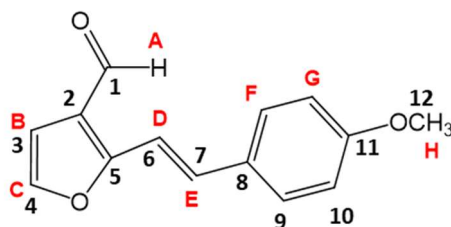
trans-6



cis-6

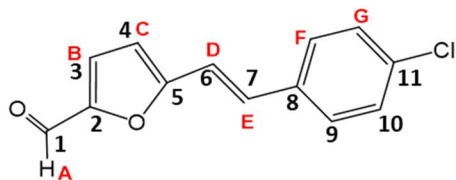
trans-5-(4-metoksistiril)furan-2-karbaldehid (trans-6): 90 mg (izoliran, 17.4%); R_f (PE:E=10:1) = 0.22; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9.56 (s, 1H, H_A), 7.44 (d, 2H, $J = 8.56$ Hz, $\text{H}_{F/G}$), 7.34 (d, 1H, $J = 17.3$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 7.24 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, $\text{H}_{B/C}$), 6.90 (d, 2H, $J = 9.07$ Hz, $\text{H}_{F/G}$), 6.78 (d, 1H, $J = 16.14$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.47 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, $\text{H}_{B/C}$), 3.82 (s, 3H, H_H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 176.68 (d, C_1), 160.27 (s, C_{KV}), 159.32 (s, C_{KV}), 151.37 (d, C_{AR}), 134.24 (s, C_{KV}), 133.00 (d, C_{AR}), 128.37 (d, $\text{C}_{9/10}$), 114.30 (d, $\text{C}_{9/10}$), 112.95 (d, C_{AR}), 110.09 (d, C_{AR}), 55.36 (q, C_{12}).

cis-5-(4-metoksistiril)furan-2-karbaldehid (cis-6): 17 mg (izoliran, 3.38 %); R_f (PE:E=10:1) = 0.27; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9.54 (s, 1H, H_A), 7.42 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{F/G}$), 7.13 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz, $\text{H}_{B/C}$), 6.89 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $\text{H}_{F/G}$), 6.73 (d, 1H, $J = 12.36$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.41 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz, $\text{H}_{B/C}$), 6.36 (d, 1H, $J = 13.2$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 3.84 (s, 3H, H_H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 174.42 (d, C_1), 166.15 (s, C_{KV}), 157.90 (d, C_{AR}), 149.15 (s, C_{KV}), 134.33 (d, C_{AR}), 130.14 (s, C_{KV}), 128.61 (d, C_{AR}), 115.98 (d, C_{AR}), 113.95 (d, C_{AR}), 111.44 (d, C_{AR}), 55.21 (q, C_{12}).

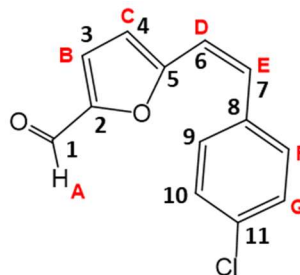


trans-7

trans-2-(4-metoksistiril)furan-3-karbaldehid (trans-7): 60 mg (izoliran, 26.0 %); R_f (PE:E=100:1) = 0.15; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9.88 (s, 1H, H_A), 7.57 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, $\text{H}_{B/C}$), 7.49 (d, 2H, $J = 9.1$ Hz, $\text{H}_{F/G}$), 7.47 (d, 1H, $J = 16.9$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 7.09 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.91 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, $\text{H}_{F/G}$), 6.83 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, $\text{H}_{B/C}$), 3.84 (s, 3H, H_H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 178.42 (d, C_1), 160.30 (s, C_{KV}), 147.53 (d, C_{AR}), 134.86 (d, C_{AR}), 129.16 (s, C_{KV}), 128.47 (d, C_{AR}), 114.41 (d, C_{AR}), 113.92 (d, C_{AR}), 109.67 (d, C_{AR}), 55.36 (q, C_{12}).



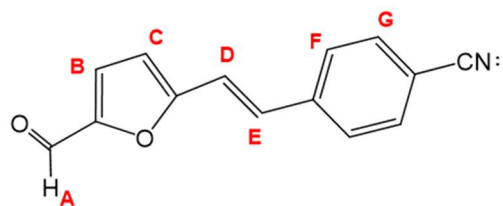
trans-8



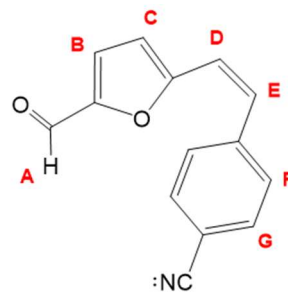
cis-8

***trans*-5-(4-klorostiril)furan-2-karbaldehid (*trans-8*):** 62.7 mg (izoliran, 10.21 %); R_f (PE:E=10:1) = 0.18; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 9.57 (s, 1H, H_A), 7.41(d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $\text{H}_{F/G}$), 7.32 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $\text{H}_{F/G}$), 7.31 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 7.24 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz, $\text{H}_{B/C}$), 6.88 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.53 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz, $\text{H}_{B/C}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 176.97 (d, C_1), 158.29 (s, C_{KV}), 151.81 (s, C_{KV}), 134.63 (s, C_{KV}), 134.34 (s, C_{KV}), 131.85 (d, C_{AR}), 129.10 (d, C_{AR}), 128.12 (d, C_{AR}), 115.52 (d, C_{AR}), 111.01 (d, C_{AR}).

***cis*-5-(4-klorostiril)furan-2-karbaldehid (*cis-8*):** 128 mg (izoliran, 20.8 %); R_f (PE:E=10:1) = 0.23; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 9.54 (s, 1H, H_A), 7.38 (d, 2H, $J = 8.39$ Hz, $\text{H}_{F/G}$), 7.34 (d, 2H, $J = 8.39$ Hz, $\text{H}_{F/G}$), 7.13 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, $\text{H}_{B/C}$), 6.73 (d, 1H, $J = 13.11$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.47 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz, $\text{H}_{D/E}$), 6.34 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, $\text{H}_{B/C}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 177.41 (d, C_1), 156.71 (s, C_{KV}), 151.15 (s, C_{KV}), 135.00 (d, C_{AR}), 134.76 (s, C_{KV}), 134.16 (d, C_{AR}), 132.81 (d, C_{AR}), 129.98 (d, C_{AR}), 128.98 (d, C_{AR}), 117.66 (d, C_{AR}), 112.28 (d, C_{AR}).



trans-9



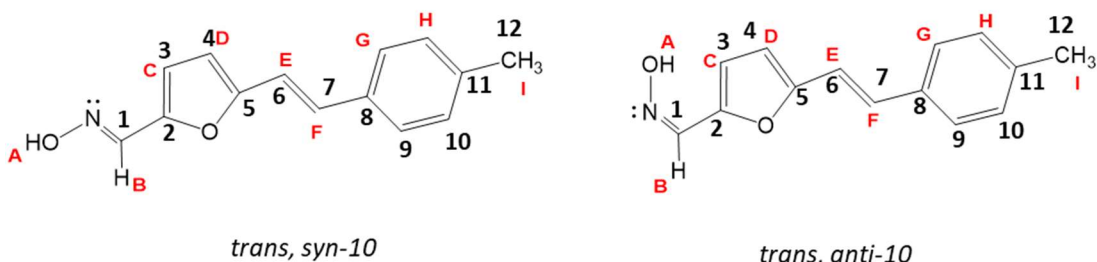
cis-9

***trans*-4-(2-(5-formilfuran-2-yl)vinyl)benzonitril (*trans*-9):** 62.25 mg (izoliran, 9.30 %); R_f (PE:E=10:2) = 0.23; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9.36 (s, 1H, HA), 7.66 (d, 2H, J = 7.96 Hz, HF/G), 7.59 (d, 2H, J = 8.29 Hz, HF/G), 7.37 (d, 1H, J = 16.47 Hz, HD/E), 7.28 (d, 1H, J = 3.8 Hz, HB/C), 7.03 (d, 1H, J = 16.7 Hz, HD/E), 6.64 (d, 1H, J = 3.8 Hz, HB/C).

***cis*-4-(2-(5-formilfuran-2-yl)vinyl)benzonitril (*cis*-9):** 20.75 mg (izoliran, 3.10 %); R_f (PE:E=10:2) = 0.33; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9.54 (s, 1H, HA), 7.65 (d, 2H, J = 7.7 Hz, HF/G), 7.48 (d, 2H, J = 7.8 Hz, HF/G), 7.16 (d, 1H, J = 3.8 Hz, HB/C), 6.76 (d, 1H, J = 13.1 Hz, HD/E), 6.56 (d, 1H, J = 12.3 Hz, HD/E), 6.37 (d, 1H, J = 3.8 Hz, HB/C).

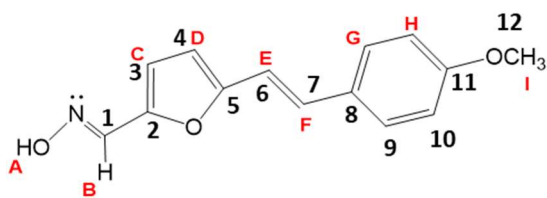
4.4 Sinteza oksima **10-14**

Oksimi **10-14** dobiveni su iz produkata Vilsmeier-Haackovog formiliranja **5-9**. U tikvicu od 25 ml ulije se smjesa otapala EtOH/H₂O u omjeru 10:3. U tako pripremljenoj otopini otopi se kristali NH₂OH·HCl te se nakon toga u tikvicu doda odgovarajući aldehid furostilbena. Reakcijska smjesa miješa se 24 sata na sobnoj temperaturi. Završetak reakcije potvrđuje se tankoslojnom kromatografijom. Po završetku reakcije, otapalo se uparava na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom. Suha reakcijska smjesa se potom pročišćava kolonskom kromatografijom na silikagelu korištenjem eluensa PE/DCM i DCM/MeOH promjenjive polarnosti.

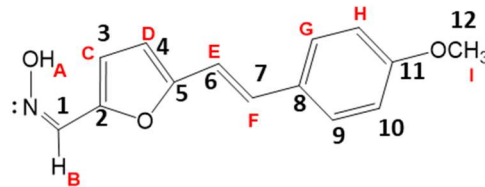


***trans, syn*-(1E)-5-(4-metilstiril)furan-2-karbaldehid oksim (*trans, syn*-10):** 202.5 mg (izoliran, 27.44 %); R_f (DCM:MeOH=100:1) = 0.35; $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 7.99 (s, 1H, HB), 7.59 (s, board, 1H, HA), 7.37 (d, 2H, J = 8.2 Hz, HG/H), 7.17 (d, 1H, J = 16.0 Hz, HE/F), 7.15 (d, 2H, J = 7.6 Hz, HG/H), 6.83 (d, 1H, J = 3.6 Hz, HC/D), 6.38 (d, 1H, J = 3.47 Hz, HC/D), 2.35 (s, 3H, HI); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 155.31 (d, C_{AR}), 146.19 (s, C_{KV}), 140.24 (d, C_{AR}), 138.12 (s, C_{KV}), 133.77 (s, C_{KV}), 129.54 (s, C_{KV}), 129.52 (d, C_{AR}), 126.55 (d, C_{AR}), 115.38 (d, C_{AR}), 114.69 (d, C_{AR}), 109.88 (d, C_{AR}), 21.32 (q, C₁₂).

***trans, anti*-(1E)-5-(4-metilstiril)furan-2-karbaldehid oksim (*trans, anti*-10):** 168 mg (izoliran, 22.7 %); R_f (DCM:MeOH=100:1) = 0.26; $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 7.53 (s, 1H, HB), 7.38 (d, 2H, J = 7.1 Hz, HG/H), 7.31 (d, 1H, J = 3.08 Hz, HC/D), 7.16 (d, 2H, J = 7.7 Hz, HG/H), 7.15 (d, 1H, J = 16.0 Hz, HE/F), 6.84 (d, 1H, J = 16.5 Hz, HE/F), 6.46 (d, 1H, J = 3.3 Hz, HC/D), 2.36 (s, 3H, HI); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 140.33 (d, C_{AR}), 137.42 (d, C_{AR}), 133.69 (s, C_{KV}), 129.65 (d, C_{AR}), 126.57 (d, C_{AR}), 120.34 (d, C_{AR}), 114.88 (d, C_{AR}), 110.85 (d, C_{AR}), 21.36 (q, C₁₂).



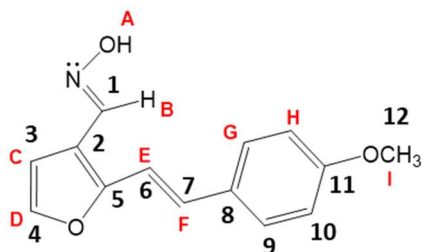
trans, syn-11



trans, anti-11

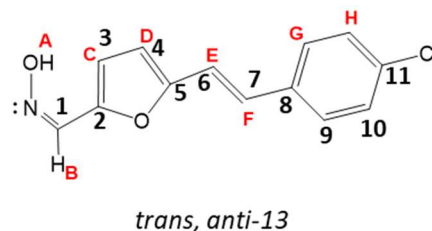
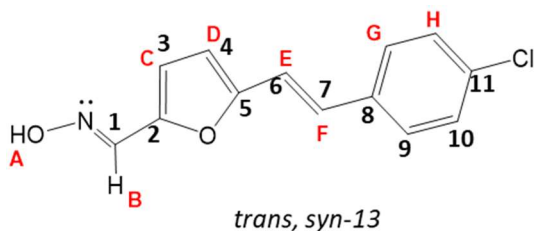
***trans, syn*-(1*E*)-5-(4-metoksistiril)furan-2-karbaldehid oksim (*trans, syn-11*):** 7 mg (izoliran, 6.4 %); R_f (DCM:E=100:1) = 0.26; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7.97 (s, 1H, HB), 7.51 (s, 1H, board, HA), 7.41 (d, 2H, J = 8.49 Hz, HG/H), 7.14 (d, 1H, J = 16.28 Hz, HE/F), 6.88 (d, 2H, J = 9.20 Hz, HG/H), 6.74 (d, 1H, J = 16.28 Hz, HE/F), 6.63 (d, 1H, J = 2.83 Hz, HC/D), 6.36 (d, 1H, J = 3.5 Hz, HC/D), 3.82 (s, 3H, HI); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 140.27 (d, C_{AR}), 129.17 (d, C_{AR}), 127.88 (d, C_{AR}), 115.41 (d, C_{AR}), 114.25 (d, C_{AR}), 113.58 (d, C_{AR}), 109.49 (d, C_{AR}), 55.33 (q, C_{12}).

***trans, anti*-(1*E*)-5-(4-metoksistiril)furan-2-karbaldehid oksim (*trans, anti-11*):** 10 mg (izoliran, 9.14 %); R_f (DCM:E=100:1) = 0.20; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7.52 (s, 1H, HB), 7.42 (d, 2H, J = 8.53 Hz, HG/H), 7.32 (d, 1H, J = 3.6 Hz, HC/D), 7.11 (d, 1H, J = 16.0 Hz, HE/F), 6.89 (d, 2H, J = 8.6 Hz, HG/H), 6.75 (d, 1H, J = 15.9 Hz, HE/F), 6.44 (d, 1H, J = 3.4 Hz, HC/D), 3.82 (s, 3H, HI).



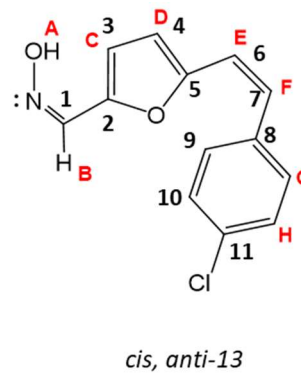
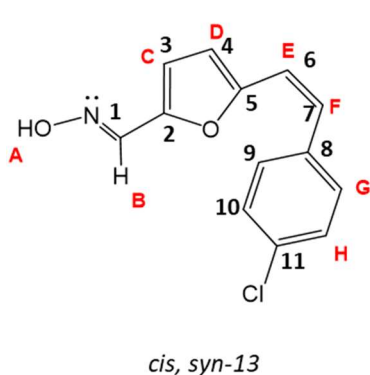
trans, syn-12

***trans, syn*-(1*E*)-2-(4-metoksistiril)furan-3-karbaldehid oksim (*trans, syn-12*):** 10 mg (izoliran, 19.55 %); R_f (DCM:MeOH=100:1) = 0.34; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 8.22 (s, 1H, HB), 7.86 (s, board, 1H, HA), 7.43 (d, 1H, J = 1.5 Hz, HC/D), 7.42 (d, 2H, J = 8.6 Hz, HG/H), 7.03 (d, 1H, J = 16.17 Hz, HE/F), 6.89 (d, 2H, J = 8.74 Hz, HG/H), 6.88 (d, 1H, J = 16.04 Hz, HE/F), 6.70 (d, 1H, J = 1.9 Hz, HC/D), 3.83 (s, 3H, HI); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 159.00 (s, C_{KV}), 143.89 (d, C_{AR}), 142.24 (s, C_{KV}), 139.47 (d, C_{AR}), 130.08 (d, C_{AR}), 128.97 (s, C_{KV}), 127.13 (d, C_{AR}), 126.21 (d, C_{AR}), 114.43 (d, C_{AR}), 113.50 (d, C_{AR}), 108.52 (d, C_{AR}), 54.72 (q, C_{12}).



***trans, syn*-(1*E*)-5-(4-klorostiril)furan-2-karbaldehid oksim (*trans, syn-13*):** 19 mg (izoliran, 49.87 %); R_f (DCM:MeOH=100:1) = 0.44; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7.98 (s, 1H, HB), 7.49 (s, board, 1H, HA), 7.39 (d, 2H, J = 8.4 Hz, HG/H), 7.31 (d, 2H, J = 8.5 Hz, HG/H), 7.13 (d, 1H, J = 16.29 Hz, HE/F), 6.84 (d, 1H, J = 16.15 Hz, HE/F), 6.65 (d, 1H, J = 3.5 Hz, HC/D), 6.42 (d, 1H, J = 3.47 Hz, HC/D); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 154.67 (d, C_{AR}), 146.62 (s, C_{KV}), 140.25 (s, C_{KV}), 135.06 (s, C_{KV}), 133.68 (s, C_{KV}), 128.88 (d, C_{AR}), 128.00 (d, C_{AR}), 127.62 (d, C_{AR}), 116.13 (d, C_{AR}), 115.33 (d, C_{AR}), 110.71 (d, C_{AR}).

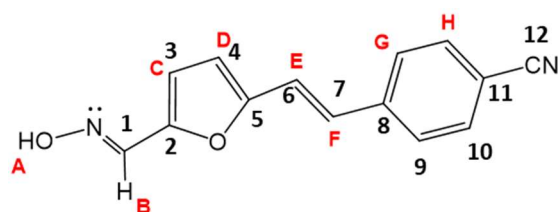
***trans, anti*-(1*E*)-5-(4-klorostiril)furan-2-karbaldehid oksim (*trans, anti-13*):** 5 mg (izoliran, 13.12 %); R_f (DCM:MeOH=100:1) = 0.34; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7.53 (s, 1H, HB), 7.41 (d, 2H, J = 8.4 Hz, HG/H), 7.32 (d, 2H, J = 8.9 Hz, HG/H), 7.30 (d, 1H, J = 2.7 Hz, HC/D), 7.09 (d, 1H, J = 16.01 Hz, HE/F), 6.85 (d, 1H, J = 16.1 Hz, HE/F), 6.49 (d, 1H, J = 3.7 Hz, HC/D); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 140.11 (d, C_{AR}), 128.98 (d, C_{AR}), 128.10 (d, C_{AR}), 127.72 (d, C_{AR}), 116.07 (d, C_{AR}), 115.33 (d, C_{AR}), 110.70 (d, C_{AR}).



***cis, syn*-(1*E*)-5-(4-klorostiril)furan-2-karbaldehid oksim (*cis, syn-13*):** 39 mg (izoliran, 23.48 %); R_f (DCM:MeOH=100:1) = 0.73; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7.97 (s, 1H, HA), 7.91 (s, 1H, HB), 7.40 (d, 2H, J = 7.6 Hz, HG/H), 7.31 (d, 2H, J = 7.6 Hz, HG/H), 6.56 (d, 1H, J = 3.48 Hz, HC/D), 6.50 (d, 1H, J = 12.65 Hz, HE/F), 6.38 (d, 1H, J = 12.55 Hz, HE/F), 6.28 (d, 1H, J = 3.5 Hz, HC/D); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm:

152.88 (s, C_{KV}), 145.55 (s, C_{KV}), 139.66 (d, C_{AR}), 134.81 (s, C_{KV}), 132.98 (s, C_{KV}), 129.46 (d, C_{AR}), 128.46 (d, C_{AR}), 128.01 (d, C_{AR}), 117.53 (d, C_{AR}), 113.77 (d, C_{AR}), 111.47 (d, C_{AR}).

cis, anti-(1E)-5-(4-klorostiril)furan-2-karbalehid oksim (cis, anti-13): 45 mg (izoliran, 27.10 %); *R_f* (DCM:MeOH=100:1) = 0.50; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ/ppm: 8.63 (s, board, 1H, HA), 7.39 (s, 1H, HB), 7.38-7.28 (m, 4H, HG, HH), 7.23 (d, 1H, J = 3.2 Hz, HC/D), 6.54 (d, 1H, J = 12.8 Hz, HE/F), 6.38 (d, 1H, J = 3.4 Hz, HC/D), 6.37 (d, 1H, J = 12.8 Hz, HE/F); ¹³C NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ/ppm: 152.25 (s, C_{KV}), 143.86 (d, C_{AR}), 136.99 (s, C_{KV}), 135.32 (s, C_{KV}), 133.52 (s, C_{KV}), 130.12 (d, C_{AR}), 129.34 (d, C_{AR}), 128.39 (d, C_{AR}), 119.72 (d, C_{AR}), 117.85 (d, C_{AR}), 112.98 (d, C_{AR}).



trans, syn-14

trans, syn-4-(2-(5-((E)-(hidroksiimino)metil)tiofen-2-il)vinil)benzonitril (trans, syn-14): 12mg (izoliran, 14.05 %); *R_f* (DCM:MeOH=100:1) = 0.23; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ/ppm: 8.00 (s, 1H, HB), 7.99 (s, 1H, HA), 7.65 (d, 2H, J = 8.26 Hz, HG/H), 7.52 (d, 2H, J = 8.3 Hz, HG/H), 7.13 (d, 1H, J = 16.26 Hz, HE/F), 6.96 (d, 1H, J = 16.39 Hz, HE/F), 6.67 (d, 1H, J = 3.38 Hz, HC/D), 6.51 (d, 1H, J = 3.65 Hz, HC/D); ¹³C NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ/ppm: 153.43 (s, C_{KV}), 146.77 (s, C_{KV}), 145.62 (s, C_{KV}), 140.56 (s, C_{KV}), 139.63 (d, C_{AR}), 131.83 (d, C_{AR}), 126.82 (d, C_{AR}), 119.75 (d, C_{AR}), 114.78 (d, C_{AR}), 112.60 (d, C_{AR}), 111.82 (d, C_{AR}), 110.34 (s, C_{KV}).

5. ZAKLJUČAK

Novi furostilbeni **1-4** sintetizirani su Wittigovom reakcijom, kao smjese *cis*- i *trans*-izomera. Nakon što su izomeri izolirani iz smjese, podvrgnuti su Vilsmeier-Haackovom formiliranju čime nastaju aldehidi **5-9**. Na temelju dobivenih rezultata spektroskopske analize produkata **5-9** (asignacijom ^1H NMR spektara), vidljivo je da su *trans*-izomeri početnih spojeva **1-4** uspješnije reagirali u provedenom formiliranju u odnosu na *cis*-izomere. U trećem stupnju reakcije aldehidi se prevode u oksime **10-14** koji literaturno nisu poznati. S obzirom na položaj etenske skupine sintetizirani derivati mogu biti *cis*- ili *trans*-, a s obzirom na položaj elektronskog para dušika unutar oksimske skupine, odnosno položaj -OH skupine i vodika na dvostrukoj vezi između ugljika i dušika, mogu biti *syn*- ili *anti*-. Oksim **13** jedini daje sva četiri izomera, dok svi izomeri spojeva **10**, **11**, **12** i **14** nisu dobiveni u čistom stanju, stoga nisu okarakterizirani. Nakon tri koraka sinteze, konačni produkti odvojeni su iz smjesa izomera kolonskom i/ili tankoslojnom kromatografijom te su spektroskopski okarakterizirani jednodimenzionalnim (^1H , ^{13}C) i dvodimenzionalnim (COSY) NMR tehnikama. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da u većem iskorištenju nastaju *trans*-izomeri, dok se *cis*-izomeri javljaju samo kod derivata **13**.

U ovom radu provedeno je i računalno istraživanje elektronske strukture, termodinamičke stabilnosti i mehanizma reaktivacije kolinesteraza, na sintetiziranim oksimskim derivatima **10-14**. Također, računski su dobiveni i UV-Vis spektri oksima, korištenjem vremenski ovisne teorije funkcionala gustoće. Vrijednosti λ_{max} kreću se od 457 do 469 nm, a sve navedene apsorpcije odgovaraju HOMO \rightarrow LUMO prijelazu. Kod ispitivanja mehanizma reaktivacije, korišten je manji modelni sustav, a rezultati sugeriraju da su *anti*-izomeri kinetički povoljniji u odnosu na *syn*-izomere, bez obzira na *cis-trans* izomeriju. Prisustvo različitih supstituenata na fenilu nije imalo utjecaja na kinetiku. Na kraju, molekulskim *dockingom* dobivene su strukture kompleksa između oksimskih furostilbena sintetiziranih u ovom radu i aktivnog mjesta butirilkolinesteraze inhibirane tabunom.

Na temelju preliminarnih eksperimentalnih rezultata testiranja reaktivacije kolinesteraza 2-tienilnim heterostilbenskim oksimima, te podataka dobivenih molekulskim *dockingom*, oksimski derivati furostilbena biti će eksperimentalno testirani za reaktivaciju kolinesteraza.

6. LITERATURA

1. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, **62** (2011) 175-190.
2. G. A. Alles, R. C. Hawes, Cholinesterases in the blood of man, *J. Biol. Chem.* **133** (1940) 375-390.
3. V. P. Whittaker, How the cholinesterases got their modern names, *Chem.-Biol. Interact.* **187** (2010) 23-26.
4. N. Maček Hrvat, Kolinesteraze i oksimi kao pseufokatalitička čistila živčanih bojnih otrova, Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematični fakultet (2015) str. 6-10.
5. Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data, *Nucleic Acids Res.* **47** (2019) 520-528.
6. A. Saxena, A. M. G. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, B. P. Doctor, Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterase revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase, *Chem. Biol. Interact.* (1999) 119-120.
7. A. Shafferman, A. Ordentlich, D. Barak, D. Stein, N. Ariel, B. Velan, Aging of phosphorylated human acetylcholinesterase: catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre, *Biochem. J.* **318** (1996) 833-840.
8. F. Nachon, P. Masson, Y. Nicolet, O. Lockridge, J. C. Fontecilla-Camps, Comparison of structures of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase, *Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors*, London (2003) str. 39.
9. Z. Radić, N. A. Pickering, D. C. Vellom, S. Camp, P. Taylor, Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry* **32** (1993) 12074-84.
10. P. Taylor, Z. Radić, The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34** (1994) 281-320.
11. B. Holmstedt, Cholinesterase inhibitors: an introduction, *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*, London (2000) str. 1-8.
12. M. Eto, Organic and biological chemistry, The organophosphorus pesticides. Cleveland (1976) str. 142.
13. L. G. Costa, Current issue in organophosphate toxicology, *Clin. Chim. Acta.* **366** (2006) 1-13.
14. R. T. Delfino, T. S. Ribeiro, J. D. Figueroa-Villar, Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *J. Braz. Chem. Soc.* **20** (2009) 407-28.
15. H. John, F. Balszuweit, K. Kehe, W. Franzand, H. Thiermann, Toxicokinetic Aspects of Nerve Agents and Vesicants, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Elsevier, (2015) str. 817–856.
16. N. B. Munro, S. S. Talmage, G. D. Griffin, L. C. Waters, A. P. Watson, J. F. King, V. Hauschild, The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products, *Environ. Health Perspect.* **107** (1999) 933–974.

17. S. E. Czerwinski, J. P. Skvorak, D. M. Maxwell, D. E. Lenz, S. I. Baskin, Effect of octanol:water partition coefficients of organophosphorus compounds on biodistribution and percutaneous toxicity, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **20** (2006) 241–246.
18. T. Zorbaz, Novi pristup analizi oksima dizajniranih za zaštitu središnjeg živčanog sustava pri trovanju organofosforinim spojevima, Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet (2019) str. 5-27.
19. I. B. Wilson, Acetylcholinesterase. XI. Reversibility of tetraethyl pyrophosphate, *J. Biol. Chem.* **190** (1951) 111–117.
20. D. R. Davies i A. L. Green, The chemotherapy of poisoning by organophosphate anticholinesterases, *Br. J. Ind. Med.* **16** (1959) 128–134.
21. M. Jokanović, Pyridinium oximes in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Elsevier (2015) str. 1057–1070.
22. J. Kassa, J. Cabal, A comparison of the efficacy of acetylcholinesterase reactivators against cyclohexyl methylphosphonofluoridate (GF agent) by in vitro and in vivo methods, *Pharmacol. Toxicol.* **84** (1999) 41–45.
23. K. Kuča, J. Cabal, J. Kassa, A comparison of the efficacy of a bispyridinium oxime-1,4-bis-(2-hydroxyiminomethylpyridinium) butane dibromide and currently used oximes to reactivate sarin, tabun or cyclosarin-inhibited acetylcholinesterase by in vitro methods, *Pharmazie* **59** (2004) 795–798.
24. M. Čalić, A. Lucić Vrdoljak, B. Radić, D. Jelić, D. Jun, K. Kuča, Z. Kovarik, In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: Mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity, *Toxicology* **219** (2006) 85–96.
25. M. Jokanović, Pyridinium oximes in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R. C. Gupta (ur.), Elsevier, 2015., str. 1057–1070.
26. K. Kuča, D. Jun, K. Musilek, Structural Requirements of acetylcholinesterase reactivators, *Mini-Reviews Med. Chem.* **6** (2006) 269–277.
27. G. Ocskay, L. Vargha, Untersuchungen über furan-verbindingen—V, *Tetrahedron* **2** (1958) 140.
28. A. Abele, E. Lukevics, Furan and thiophene oximes: synthesis, reactions and biological activity (Review), *Chem. of Heterocyclic Comp.* **2** (2001) 141-170.
29. T. L. Gilchrist, T. G. Roberts, Addition of 3-nitrosobut-3-en-2-one to olefins and to electron-rich heterocycles, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1978) 847.
30. S. Kanemasa, H. Matsuda, A. Kamimura, T. Kakinami, Synthesis of hydroximoyl chlorides from aldoximes and benzyltrimethylammonium tetrachloroiodate (BTMA ICl₄), *Tetrahedron*, **56** (2000) 1057.
31. E. Abele, Yu. Polelis, E. Lukevits, M. Shimanska, Yu. Gol'dberg, *Khim. Geterotsikl. Soedin.* (1994) 18.
32. U. Pindur, B. Unterhalt, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **312** (1979) 282.
33. E. Ya. Lukevits, M. G. Voronkov, *Khim. Geterotsikl. Soedin* (1965) 36.
34. Y. Kita, F. Iyoh, O. Tamura, Y. Y. Ke, T. Miki, Y. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **37** (1989) 1446.

35. S. S. Pelosi, Jr., US Pat. No. 3946049; Chem. Abstr., **85** (1976) 21083.
36. M. von Eisch, A. J. Crovetti, US Pat. No. 3272833; Chem. Abstr., **66** (1967) 37761.
37. T. Sasaki, T. Yoshioka, Bull. Chem. Soc. Japan, **42** (1969) 556.
38. T. Sasaki, T. Yoshioka, Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi, **25** (1967) 665; Chem. Abstr., **68** (1968) 12789.
39. D. J. Ager, J. Chem. Res. (S), (1985) 237.
40. W. Zhao, Huahue Shiji, **19** (1997) 273; Chem. Abstr., **127** (1997) 330917.
41. H. Migulla, H. Paul, East Ger. Pat. No. 130148; Chem. Abstr., **91** (1979) 39306.
42. R. Cho, N. S. Cho, S. H. Song, S. K. Lee, J. Org. Chem., **63** (1999) 8304.
43. S. Morikawa, S. Teratake, Jap. Pat. No. 7919963; Chem. Abstr., **91** (1979) 39301.
44. A. Obregia, C. V. Gheorghiu, J. Prakt. Chem., **128** (1930) 239; Chem. Abstr., **25** (1931) 1506.
45. E. Abele, R. Abele, E. Lukevics, Latv. J. Chem., (1999) 63.
46. L. Beregi, Magyar Kem. Folyoirat, **56** (1950) 257; Chem. Abstr., **46** (1952) 8000.
47. W. Reeve, J. Christian, J. Am. Chem. Soc., **78** (1956) 860.
48. P. Bessin, J. Laforest, G. Thuillier, US Pat. No. 4207319; Chem. Abstr., **93** (1980) 220574.
49. J. Engel, A. Kleeman, F. Stroman, K. Thiemer, Ger. Pat. No. 2851387; Chem. Abstr., **91** (1979) 74460.
50. V. Philips' Gloeilampenfabrieken, Netherlands Patent No. 6810133; Chem. Abstr., **72** (1970) 121354.
51. J. S. Knutsen K. E. Andersen, J. Lau, B. F. Lundt, R. F. Henry, H. E. Morton, L. Naerum, H. Peterson, H. Stephenson, P. D. Suzdak, M. D. B. Swedberg, C. Thomsen, P. E. Sorensen, J. Med. Chem., **42** (1999) 3447.
52. J. R. Nicolaus, E. Testa, British Patent No. 964721; Chem. Abstr., **61** (1964) 9467.
53. R. G. Stein, A. J. Crovetti, T. L. Crouch, Ger. Pat. No. 2262189; Chem. Abstr., **79** (1973) 66160.
54. F. J. Ekström, C. Astot, Y-P. Pang, Novel nerve-agent antidote design based on crystallographic and mass spectrometric analyses of tabun-conjugated acetylcholinesterase in complex with antidotes. Clin. Pharmacol. Ther. **82** (2007) 282-93.
55. G. H. Lushington, J-X. Guo, M. M. Hurley, Acetylcholinesterase reprised: Molecular modeling with the whole toolkit. Front. Med. Chem. **5** (2010) 423-56.
56. X-Y. Meng, H-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, Curr. Comput. Aided Drug Des. **7** (2011) 146-157.
57. G. M. Morris, M. Lim-Wilby, Molecular Docking. Molecular Modeling of Proteins, Methods in Molecular Biology, **443** (2008) 365–382.
58. R. Lo, N. B. Chander, M. K. Kesharwani, A. Jain, B. Ganguly, In silico studies in probing the role od kinetic and structural effects of diifferent drugs for the reactivation od tabun-inhibited AChE, PLoS ONE **8** (2013)
59. K. Musilek, M. Komloova, O. Holas, A. Horova, M. Pohanka, F. Gunn-Moore, V. Dohnal, M. Dolezal, K. Kuca, Mono-oxime bisquaternary acetylcholinesterase reactivation with prop-1,3-diyl linkage-Preparation, in vitro screening and molecular docking, Bioorg. and Medic. Chem. **19** (2011) 754-762.
60. M. Edmonds, A. Abell, The Wittig Reaction, Modern Carboyl Olefination (2004) 1-17.

61. M. Schlosser, K. F. Christmann, *Liebigs Ann.* 708 (1967) 1.
62. O. Meth-Cohn, S. P. Stanforth, The Vilsmeier-Haack Reaction, *Comprehensive Organic Synthesis* (1991) 777-794.
63. E. Runge, E. K. U. Gross, Density-functional theory for time-dependent systems, *Phys. Rev. Lett.* **52** (1984) 997.
64. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Fanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility, *J. Comput. Chem.*, 16 (2009) 2785–2791.
65. https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00003dly (pristup 28. lipnja 2021.)

ŽIVOTOPIS

Ana Vukovinski [REDACTED] Srednjoškolsko obrazovanje je završila u Gimnaziji A. G. Matoš u Samoboru, nakon čega upisuje preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. U sklopu studija 2018. godine odrađuje studentsku praksu na Institutu Ruđer Bošković, na zavodu za Organsku kemiju i biokemiju. 2019. godine stječe naziv prvostupnice primijenjene kemije (univ. bacc. appl. chem.), nakon obrane završnog rada pod mentorstvom prof. dr. sc. Irene Škorić. Iste godine upisuje diplomski studij Primijenjena organska kemija na istom fakultetu te ostvaruje pravo na stipendiju grada Samobora, Zagrebačke županije i tvrtke PLIVA HRVATSKA d.o.o., na temelju kriterija izvrsnosti. Aktivna je članica Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa, u sklopu koje je nagrađena Dekanovom i Rektorovom nagradom za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici, za studentski projekt Boje inženjerstva. Na zadnjoj godini studija postaje urednica rubrike Znanstvenik u znanstveno-popularnom časopisu Reaktor ideja.